

Beitrag zur Strukturaufklärung des Polysaccharids
in Flores Chamomillae

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Willi Weißer
Frankfurt am Main
1962

Gedruckt mit Genehmigung
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main



Dekan: Prof.Dr.K.Egle

1.Referent : Prof.Dr.H.Janecke

2.Referent : Prof.Dr.C.Rohmann

Tage der mündlichen Prüfung: 15. u. 16.2.1962

Tag der Promotion: 26.2.1962

Inhaltsübersicht

	Seite
1 <u>Einleitung</u>	4
2 <u>Allgemeiner Teil</u>	6
2.1 Einteilungs- und Baumöglichkeiten der Polysaccharide	6
2.2 Möglichkeiten zur Strukturaufklärung	10
3 <u>Allgemeiner Versuchsteil</u>	16
3.1 Gewinnungs- und Reinigungsmethoden	16
3.2 Verhalten des Schleimes gegenüber Alkali	17
3.3 Qualitative und quantitative Baustein- analyse	19
3.4 Physiko-chemische Strukturaufklärungs- methoden	21
3.5 Chemische Methoden zur Strukturaufklärung	24
3.6 Diskussion der Versuchsergebnisse	64
4 <u>Experimenteller Teil</u>	69
4.1 Gewinnung, Reinigung und Verhalten gegenüber Alkali	71
4.2 Qualitative und quantitative Bestimmung der Zuckerbausteine	73
4.3 Einige chemische Eigenschaften	76
4.4 Einige physikalische Eigenschaften	78
4.5 Perjodatoxydation	80
4.6 Acetylierung	87
4.7 Methylierung des Schleimes und des Acetylprodukts	88
4.8 Methanolyse und Hydrolyse des O-Methylprodukts	88
4.9 Trennung und Isolierung der O-Methylzucker	89
5 <u>Zusammenfassung</u>	98
6 Literaturverzeichnis	102

1 Einleitung

Die Strukturaufklärung von Polysacchariden nimmt einen breiten Raum in der phytochemischen Forschung ein (1,2,3). Insbesondere Hemicellulosen und Pflanzenschleime wurden unter Anwendung von zahlreichen physikalisch-chemischen und chemischen Methoden untersucht (z.B. 120-148). Die Polysaccharid-Erforschung und ihre Ergebnisse lassen sich historisch in mehrere Abschnitte gliedern:

Bis zum Jahre 1900 erstreckte sich die Arbeit nur auf die Gewinnung und Reinigung der Stoffe, die zumeist schon lange bekannt waren und technisch oft benutzt wurden. Insbesondere die Reinigung war überaus langwierig und es war schwierig, zu einem analytisch reinen Präparat zu gelangen. Chemisch-analytische Methoden waren nicht bekannt oder zu wenig spezifisch, um Einblicke in die Struktur der Moleküle zu bekommen. Die modernen physiko-chemischen Methoden standen damals noch nicht zur Verfügung.

In den ersten zwei Jahrzehnten des 20. Jahrhunderts begann mit dem Arbeiten von T. PURDIE und J. C. IRVINE (4) sowie W. N. HAWORTH (5) die eigentliche Strukturforschung. Die Methylierung, die Spaltung des O-Methylprodukts und die Trennung der O-Methylzucker - Methylglykoside durch Destillation im Vakuum ergaben schon wesentliche Einblicke in den Aufbau dieser Naturstoffe. In Ergänzung dazu wurden Methoden zu physikalisch-chemischen Molekulargewichts- und Viskositätsbestimmungen ausgearbeitet und benutzt.

Die folgende Periode ist gekennzeichnet durch die Einführung der Perjodatspaltung, der chromatographischen Methoden und der Austauschverfahren auf dem Kohlenhydratgebiet.

Die Perjodatoxydation erwies sich als ein geeignetes zusätzliches Mittel, Einblicke in die Struktur zu erlangen. Der Einsatz kleinster Substanzmengen war ein Vorteil, der

ihre Einführung auf dem Polysaccharidgebiet noch begünstigte.

Die chromatographischen Verfahren verfeinerten die Analyse sowohl der Mono- und Oligosaccharide als auch der O-Methylzucker. Die O-Methylpolysaccharide konnten nun direkt oder nach Methanolyse hydrolysiert und die O-Methylzucker an Papier oder Säule getrennt bzw. bestimmt werden.

Die Austauschverfahren erleichterten sowohl die Reinigung der Rohstoffe als auch die der Hydrolysate. Es konnten nun fast aschefreie Substanzen und Hydrolysate erhalten werden.

Die Entwicklung von vielen physikalisch-chemischen Methoden war auch für die Polysaccharidforschung von Bedeutung. Die Sedimentation in der Ultrazentrifuge, die IR-Absorption, der osmotische Druck, die Lichtstreuung und die Dielektrizitätskonstante geben wertvolle zusätzliche Auskünfte über den strukturellen Bau von Polymeren.

Neuerdings erlangt die Bestimmung der Feinstruktur durch partielle, enzymatische Hydrolyse große Bedeutung. Es ist dies wohl die zur Zeit einzige Methode, die über die Reihenfolge der Zuckerbausteine im Molekül erschöpfend Auskunft geben kann.

Gegenstand dieser Arbeit ist der wasserlösliche Schleim aus den Blüten von *Matricaria chamomilla*. H. J A N E C K E und W. K E H R (6) haben einige physikalisch-chemische Eigenschaften des Schleims bereits untersucht und seine Zuckerbausteine qualitativ und quantitativ bestimmt. In dieser Arbeit sollen die bewährten Methoden der Strukturanalyse von Polysacchariden zur Untersuchung dieses Schleims angewandt werden, um Einblicke in den strukturellen Aufbau des Schleimmoleküls zu erhalten.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Einteilungs- und Baumöglichkeiten der Polysaccharide

Die Vielfalt der strukturellen Baumöglichkeiten eines Polysaccharids erschwert die Einteilung der polymeren Verbindungen. Die unterschiedlichen Typen können aber strukturell nach verschiedenen Gesichtspunkten (2,13) geordnet werden:

Nach Herkunft:

Je nach Herkunft können sie in einer dem botanischen bzw. zoologischen System analogen Anordnung eingeteilt werden. Den aus Pflanzen isolierten Stoffen (z.B. Cellulose, Stärke, Inulin) stehen die tierischen Polysaccharide (z.B. Glykogen, Heparin, Hyaluronsäure, Chitin) gegenüber.

Nach der Anzahl der am Bau beteiligten Zuckerarten:

Man unterscheidet zwischen Homopolysacchariden (Homoglykane), die Polymere aus gleichen Zuckerbausteinen darstellen (z.B. die Glukane Cellulose, Amylose, Amylopektin und Glykogen, das Fruktan Inulin, das Galakturonan Pektin⁺) und das Mannuronan Alginssäure), und den Heteropolysacchariden (Heteroglykane), die aus zwei (Diheteroglykane) bis sechs (Hexaheteroglykane) verschiedenen Zuckerbestandteilen aufgebaut sein können. Zu der zweiten Gruppe zählen die meisten Bakterienpolysaccharide und Pflanzenschleime.

Etwas außerhalb dieser Unterteilung stehen die Makromoleküle, die mit Schwefelsäure verestert oder die teilweise oder ausschließlich aus Aminozuckereinheiten aufgebaut sind. Agar z.B., das ein teilweise mit Schwefelsäure verestertes Galaktan darstellt, Chitin, ein N-Acetyl-D-Glukosamin-Polymer, und Hyaluronsäure, die aus

⁺) Die Pektine sind meist nicht einheitlich und mit Araban und Galaktan verunreinigt.

N-Acetyl-D-Glukosamin und D-Glukuronsäure besteht, könnte man jedoch bei großzügiger Auslegung des Glykan-Begriffs zu den Homoglykanen zählen.

Nach dem räumlichen Bau des Moleküls:

Unter diesem Gesichtspunkt kann man zwischen linearen und verzweigten Polysacchariden unterscheiden.

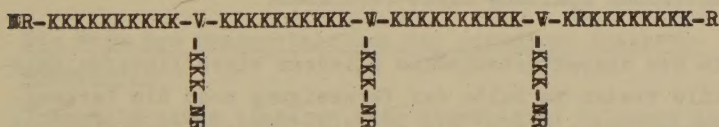
Die linearen Typen, die meist Homoglykane darstellen, besitzen drei verschiedene Molekülanteile: Die reduzierende Endgruppe und die nichtreduzierende Endgruppe, die beide nur je einmal im Molekül vorhanden sind, sowie die Kettenglieder ⁺⁾ .

NR-KKK-R

Lineare Polymere sind z.B.: Cellulose, Amylose, Lichenan und Pektin.

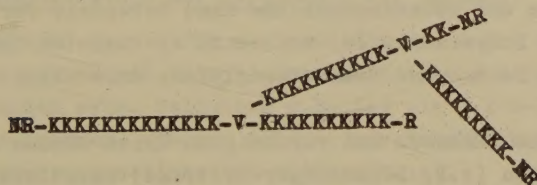
Innerhalb der Gruppe der verzweigten Polysaccharide läßt sich je nach Art der Verzweigung folgende Unterteilung treffen:

a) Seitenkettenverzweigung ("Side-chain branching")



Die meisten Pflanzenschleime und Hemicellulosen sind Beispiele für seitenverzweigte Moleküle.

b) Einfache Verzweigung ("Single branching")



⁺⁾ In den folgenden Molekülbildern bedeuten die Buchstaben Zuckereinheiten verschiedener Funktion: NR = nichtreduzierendes Endglied, R = reduzierendes Endglied, K = Kettenglied, V = Verzweigungsglied.

tisch wäre auch eine ähnliche Ringbildung in verzweigten Polysacchariden denkbar. Experimentelle Beweise liegen jedoch nicht vor.

Innerhalb dieser drei großen Unterteilungsmöglichkeiten, von denen keine ideal ist, sind die anderen strukturellen Eigenschaften ebenfalls zur Klassifizierung geeignet.

Die Molekülgröße

Die Größe des Moleküls kann zwischen einem Molekulargewicht von 3000 bis zu 6000 000, d.h. zwischen einer Bausteinzahl von 30 bis zu mehreren Zehntausend , schwanken.

Die mittlere Kettenlänge

Für die Untersuchung von verzweigten Molekülen spielt die "mittlere Kettenlänge" (in der angelsächsischen Literatur als "average chain length" bezeichnet), die sich aus dem Verhältnis zwischen der Zahl der Gesamteinheiten und der Zahl der nichtreduzierenden Endglieder ergibt, eine Rolle.

Die Form des Hemiacetalrings der einzelnen Zuckerbestandteile

Innerhalb eines linearen oder verzweigten Polymers können Furanose- und Pyranoseformen allein oder gemeinsam vorhanden sein.

Die Konfiguration der glykosidischen Bindung

Ein Molekül kann durch α -glykosidische, durch β -glykosidische oder durch Beteiligung von beiden Konfigurationen entstanden sein. Cellulose z.B. ist ein 1,4- β -D-Glukopyranose-Polymer, während Amylose hauptsächlich aus 1,4- α -D-Glukopyranose-Einheiten aufgebaut ist.

Die Art der glykosidischen Bindung

Die glykosidische Bindung kann innerhalb eines Moleküls

einheitlich (z.B. 1,4 in Cellulose; 1,3 in Laminaran) oder unterschiedlich, unter Beteiligung mehrerer Bindungstypen, vorliegen. In Heteroglykanen sind meistens die einzelnen Zuckerbestandteile einem Bindungstyp zugeordnet. Glukose z.B. findet sich meist in 1,4-glykosidischer Bindung, während Galaktose 1,3- und 1,6-glykosidische Verknüpfung offenbar vorzieht(45).

2.2 Möglichkeiten zur Strukturaufklärung ⁺)

Bausteinanalyse

Der erste Schritt im Rahmen einer Polysacchariduntersuchung besteht in einer Analyse der Monomeren. Durch hydrolytische Spaltung mit Säuren oder Enzymen kann die polymere Verbindung in ihre Zuckerbestandteile zerlegt werden, die dann qualitativ und quantitativ zu bestimmen sind. Die Spaltung läuft im allgemeinen glatt ab, doch können bei einigen Polysacchariden schwer hydrolysierbare Disaccharide oder bei uronsäurehaltigen Polymeren schwer spaltbare Aldobiuronsäuren (bestehend aus einer Uronsäure und einer Hexose bzw. Pentose, wobei sich die reduzierende Endgruppe am C₁ der Hexose bzw. Pentose befindet) entstehen. Durch papier- und säulenchromatographische Trennung können die Zucker des Hydrolysats isoliert und durch Herstellung kristalliner Derivate eindeutig identifiziert werden.

Die Erkennung des räumlichen Baus des Moleküls

Die Entscheidung, ob ein lineares oder verzweigtes Molekül vorliegt, wird durch die Ergebnisse der Perjodatspaltung und der Methylierungsanalyse bestimmt.

Der Perjodatverbrauch und die Ameisensäurebildung während der Perjodatoxydation sind ein Maß für den Verzweigungsgrad des Moleküls.

⁺) Im Rahmen des allgemeinen Teils soll nur auf die grundsätzlichen strukturellen Methoden hingewiesen werden. Ausführliche Darstellung, Diskussion und Literaturhinweise finden sich im allgemeinen Versuchsteil.

Außerdem kann nach vollständiger Methylierung und Spaltung des O-Methylprodukts aus dem Verhältnis der Menge der aus den Endgliedern entstandenen hochmethylierten Zucker (Tetra-O-methylhexosen, Tri-O-methyl-pentosen oder -hexuronsäuren) zu der Menge der aus den Kettengliedern entstandenen Zucker mit geringerem Methylierungsgrad (Tri-O-methylhexosen, Di-O-methyl-pentosen oder -hexuronsäuren) auf den Grad der Verzweigung geschlossen werden. Auch das Verhalten der Polysaccharide gegenüber kationen-aktiven Farbstoffen kann einen Hinweis auf den räumlichen Bau des Moleküls geben (115).

Erkennung der Endglieder

Durch Identifizierung der nach der vollständigen Methylierung durch Spaltung entstandenen Tetra-O-methylhexosen und Tri-O-methyl-pentosen bzw. -hexuronsäuren sind die Endgruppen im linearen oder verzweigten Molekül eindeutig zu bestimmen.

In einem linearen Molekül, in dem nur zwei Endgruppen - ein reduzierendes und ein nichtreduzierendes Endglied - vorhanden sind, ist der Nachweis der aus den Endgruppen entstehenden hochmethylierten Zucker in dem Gemisch der aus den Kettengliedern entstandenen O-Methylzucker mit geringerem Methylierungsgrad von der Konzentration der hochmethylierten Zucker und der Genauigkeit der Trennungs- und Analysemethoden abhängig. Diese Schwierigkeit besteht bei verzweigten Polymeren nicht, da die Zahl der Endglieder mit dem Verzweigungsgrad wächst.

Die Unterscheidung zwischen nichtreduzierenden und reduzierenden Endgliedern ist, sofern die beiden Endgruppentypen nicht aus dem gleichen Zucker bestehen, im Rahmen der Methylierungsanalyse nicht möglich, da aus beiden Endgruppenarten nach Methylierung und Spaltung O-Methylzucker gleichen Methylierungsgrades entstehen. Bei der Untersuchung vom verzweigten Typen kann, da in diesem Falle der aus dem reduzierenden Endglied entstehende O-Methylzucker mengenmäßig gegenüber den aus den vielen nichtreduzierenden Endgruppen gebildeten Methyläthern zurücktritt, aus der quantitativen Bestimmung der O-Methylzucker aber auf

die im intakten Molekül vorhandene reduzierende Endgruppe geschlossen werden.

Erkennung der Kettenglieder

Durch Identifizierung der im O-Methylzuckergemisch vorhandenen Tri-O-methylhexosen und Di-O-methyl-pentosen bzw. -hexuronsäuren werden die Kettenglieder des Moleküls erkannt.

Außerdem gibt die Perjodatspaltung einen Hinweis, da die Kettenglieder in den meisten Fällen (Ausnahmen finden sich in Abb. 6) α -Diol-Struktur besitzen und wie die Endglieder durch Perjodatoxydation gespalten werden.

Erkennung der Verzweigungsglieder in nichtlinearen Polysacchariden

Auch die Verzweigungsglieder können durch die beiden sich ergänzenden Verfahren, Perjodatoxydation und Methylierungsanalyse, bestimmt werden. Verzweigungspunkte, die dreifach gebunden im Molekül vorliegen, besitzen mit Ausnahme von 1,4,6- oder 1,2,6-gebundenen Hexopyranosen keine α -Diol-Struktur, werden also von Perjodat nicht angegriffen und können durch Hydrolyse nach Perjodatoxydation als Monosaccharide nachgewiesen werden.

Nach vollständiger Methylierung und Spaltung des O-Methylprodukts lassen sich die als Verzweigungsglieder vorliegenden Zucker außerdem als Di-O-methylhexosen und Mono-O-methyl-pentosen bzw. -hexuronsäuren bestimmen.

Erkennung des Polymerisationsgrades

Das Molekulargewicht eines Polysaccharids, von dem sich mit Hilfe des mittleren Anhydridgewichts der Polymerisationsgrad ableitet, kann durch physikalische und chemische Methoden bestimmt werden. Die chemischen Methoden beruhen alle auf einer Reaktion der im Molekül nur einmal vorhandenen reduzierenden Endgruppe mit geeigneten Reagentien. Da aber bei allen chemischen Methoden die Gefahr von Nebenreaktionen besteht, werden die physikalischen Verfahren (Messung des osmotischen Drucks oder Messung des Sedimentationsverhaltens in der Ultrazentrifuge) die genaueren

Werte liefern.

Erkennung der im Polysaccharidmolekül vorhandenen Hemiacetalringtypen

Aus den bei der Methylierungsanalyse resultierenden O-Methylzuckern kann nur beim Vorhandensein von 1,2-, 1,3- oder 1,6-glykosidischer Bindung eindeutig zwischen im intakten Molekül vorliegenden Pyranosen oder Furanosen unterschieden werden. 3,4,6- bzw. 2,4,6-Tri-O-methylhexosen z.B. beweisen Pyranosen, während 3,5,6- bzw. 2,5,6-Tri-O-methylhexosen Furanosen nachweisen.

Sind jedoch 1,5- oder 1,4-Bindungen oder mehrere glykosidische Bindungen unter Beteiligung von C₄ oder C₅ vorhanden, so ist kein Schluß auf die Art des Hemiacetalrings möglich; denn z.B. 1,5-gebundene Hexofuranosen bzw. 1,4-gebundene Hexopyranosen ergeben beide nach Methylierung und Spaltung 2,3,6-Tri-O-methylhexosen.

Die Entscheidung, ob C₄ an der Glykosid- und C₅ an der Hemiacetalbindung beteiligt ist oder umgekehrt, ist nicht zu treffen. Zusätzliche Hinweise kann aber das IR-Absorptionsspektrum des Polysaccharids geben, da Furanosen typische Absorptionsmaxima zeigen.

Erkennung der Konfiguration der glykosidischen Bindung

Die α - oder β -Konfiguration kann durch Messung der IR-Absorption und der Dielektrizitätskonstanten erkannt werden. α - und β -glykosidische Verknüpfungen zeigen unterschiedliche IR-Absorptionsmaxima und unterscheiden sich auch in ihren DK-Werten, da die α -glykosidischen Typen sich im elektrischen Wechselfeld dipolartig orientieren können und deshalb höhere DK-Werte besitzen als die Polysaccharide, die durch β -glykosidische Verknüpfung entstanden sind. Sind beide Konfigurationen gleichzeitig vorhanden, so sind mit diesen physikalischen Methoden keine eindeutigen Aussagen möglich.

Ein anderes Verfahren ist die enzymatische Spaltung des Moleküls mit α - bzw. β -Glykoside angreifenden Enzymen; diese kann dann nach Identifizierung der Spaltprodukte zu

weiteren Erkenntnissen führen.

Die Art der glykosidischen Verknüpfung

Die freien Hydroxylgruppen der nach vollständiger Methylierung und Spaltung entstandenen O-Methylzucker geben die Verknüpfungsstellen der Zucker im Molekül an. Beim Vorliegen von 2,4,6-Tri-O-methylgalaktose z.B. muß Galaktose im Molekül 1,3-glykosidisch gebunden vorliegen.

Auch hier kann, wenn die Hydroxylgruppe an C₄ oder C₅ der O-Methylzucker nicht methyliert ist, nicht zwischen der 1,4- und der 1,5-glykosidischen Verknüpfung unterschieden werden, da nicht bekannt ist, ob das C₄ (Pyranose) oder C₅ (Furanose) die freie Hydroxylgruppe besitzt.

Nach den bisherigen Untersuchungen ist der Kamillenschleim den niedrigmolekularen Hexaheteroglykanen zuzuordnen (6). Einen Einblick in den strukturellen Aufbau sollen die folgenden Untersuchungen geben, wobei, unter Benutzung von physikalisch-chemischen und chemischen Methoden, insbesondere die Konfiguration und die Art der glykosidischen Bindung sowie die Natur der End-, Ketten- und Verzweigungsglieder untersucht werden sollen.

	Seite
3 <u>Allgemeiner Versuchsteil</u>	16
3.1 Gewinnungs- und Reinigungsmethoden	16
3.2 Verhalten des Schleimes gegenüber Alkali	17
3.3 Qualitative und quantitative Bausteinanalyse	19
3.4 Physiko-chemische Methoden zur Strukturaufklärung	21
3.4.1 Die IR-Absorption	21
3.4.2 Die Dielektrizitätskonstante	23
3.5 Chemische Methoden zur Strukturaufklärung	24
3.5.1 Die Perjodatoxydation	24
3.5.1.1 Reaktionsmechanismus und allgemeine Bedingungen	25
3.5.1.2 Endgruppengehaltsbestimmung durch Ameisensäureanalyse	31
3.5.1.3 Endgruppengehaltsbestimmung durch Perjodatanalyse	39
3.5.1.4 Bestimmung der Verzweigungspunkte durch Hydrolyse des Oxoschleims	43
3.5.1.5 Bestimmung des α -Diolgehalts	47
3.5.1.6 Molekulargewichtsbestimmung durch Formaldehydanalyse	48
3.5.1.7 Polysaccharidabbau nach Barry	49
3.5.2 Acetylierungsmethoden	51
3.5.3 Methylierungsanalyse	52
3.5.3.1 Methylierungsmethoden	53
3.5.3.2 Methanolyse und Hydrolyse des O-Methylprodukts	54
3.5.3.3 Untersuchung des O-Methylzuckergemisches	55
3.5.3.3.1 Papierchromatographische Trennung	55
3.5.3.3.2 Papierelektrophoretische Trennung	58
3.5.3.3.3 Säulenchromatographische Trennung	59

3 Allgemeiner Versuchsteil

3.1 Gewinnungs- und Reinigungsmethoden

Aus der Fülle der bisher benutzten Extraktions- und Reinigungsverfahren sind in einer früheren Arbeit (6) schon die für den Kamillenschleim günstigsten Bedingungen ausgewählt worden. Es wird deshalb in Anlehnung an die bestehenden Vorschriften gearbeitet, um ein möglichst einheitliches Material zu erhalten.

Die Droge wurde nach äthanolischer Extraktion abgepreßt, das Preßgut wässrig erschöpfend extrahiert, der Extrakt im Vakuum eingengt und das Polysaccharidmaterial durch Umfällen mit Alkohol von Resten an ätherischem Öl und anderen Extraktivstoffen befreit.

Nach Klärung mit Celite 435 wurde die Substanz mit Austauschharzen weitgehend entsalzt und sprühgetrocknet. Während des gesamten Reinigungsprozesses wurden Aschegehalt- und Stickstoffbestimmungen durchgeführt, um den Reinigungsverlauf zu verfolgen.

Außerdem bewiesen papierchromatographische Untersuchungen, daß in keinem Stadium hydrolytische Aufspaltung eingetreten war. Es resultierten etwa 80,0 g eines hellbraunen voluminösen Pulvers. (pH 3,3; N=1,38%; Asche <0,8%; Äquivalentgewicht = 533; Uronsäureanhydridgehalt = 48%; OCH_3 = 4,6%)

Der hohe OCH_3 -Gehalt legt den Verdacht auf die Anwesenheit von O-Methylzuckern im Molekül nahe (6). Doch nach Bariumhydroxydfällung des Schleims und Reinigung des Barium-Schleims mit Aceton wurde nur ein OCH_3 -Gehalt von <0,9% gefunden. Dadurch wird wahrscheinlich, daß der Fällungsalkohol den hohen Orymethylwert verursacht hat. Er könnte verestert oder eingeschlossen die Fehlanalyse hervorrufen.

Noch drei Befunde sprechen für diese Annahme:

1.) Der OCH_3 -Gehalt des gereinigten Materials ist höher als der des noch nicht mit Alkohol behandelten Rohprodukts.

2.) Der Uronsäuregehalt, der auf titrimetrischem Wege bestimmt wurde, ist niedriger als der nach der Decarboxylierungsmethode errechnete Wert, was auf veresterten Alkohol hindeutet.

3.) Das Schleim-Hydrolysat ist frei von O-Methylzuckern.

Auch G. O. A S P I N A L L machte bei der Untersuchung von Ghatti gum ähnliche Beobachtungen und führte den hohen OCH_3 -Gehalt auf die Verwendung von Äthanol während der Reinigungsverfahren zurück (7).

3.2 Verhalten des Schleims gegenüber Alkali

Bei Behandlung des Schleims mit 0,1 n Lauge treten bei der Einwirkung von Natronlauge und Bariumhydroxyd verschiedene Effekte ein:

0,1 n NaOH verursacht schon bei relativ schonenden Bedingungen einen weitgehenden Abbau der im Molekül vorhandenen Uronsäure. E. L. H I R S T, E. G. V. P E R C I V A L und C. B. W Y L A M, die ähnliche Beobachtungen bei der Untersuchung von Plantago arenaria-Schleim machen, diskutieren zwei Möglichkeiten, die den leichten Abbau der Uronsäure erklären können (8):

- 1.) Die Uronsäure oder Aldobiuronsäure ist durch eine alkaliempfindliche Bindung mit dem Restmolekül verknüpft.
- 2.) Der Schleim ist nicht einheitlich und besteht aus einem neutralen Polysaccharidanteil, der mit einer Polyuronsäure vergesellschaftet ist.

Da der Kamillenschleim jedoch elektrophoretisch einheitlich ist (6) und nur ein Teil der Uronsäure abgespalten wird, ist die erste Möglichkeit die wahrscheinlichere. Ein Teil der Uronsäure könnte dann in besonders ausgezeichneter Bindung - etwa als Endglied - vorliegen, während die restlichen Uronsäurebausteine als Kettenglieder z.B. nicht abgespalten werden können.

Die Alkalilabilität des Moleküls ist von Bedeutung für die Diskussion der Methylierungsergebnisse, da alle Methylierungsmethoden in stark basischem Milieu ablaufen.

Mit 0,1 n Ba(OH)₂ tritt keine Abspaltung, sondern eine bei pH 9,0 praktisch quantitative Fällung des Schleimes ein. Das Hydrolysat der Barium-Fällung ist identisch mit dem Hydrolysat der nicht gefällten Substanz.

Der hohe Bariumgehalt der Fällung (19%) zeigt, daß kein Bariumsalz des sauren Polysaccharids vorliegt, sondern daß durch Barium komplexartig verknüpfte Polysaccharidmoleküle das Ausfällen hervorrufen.

H. M E I E R, der Bariumhydroxyd als selektives Fällungsmittel für Hemicellulosen bezeichnet, fällte Mannane und Galaktane und nennt als Voraussetzung zur Fällung 2,3 oder 3,4 cis-glykolische Anordnung im Hemicellulosenmolekül (9). Die evtl. als Endgruppen vorhandenen Galaktose- oder Arabinoseeinheiten, die 3,4 cis-glykolische Anordnung besitzen, würden diese Ergebnisse bestätigen und für die Fällung verantwortlich sein.

Aus diesem Ergebnis können zwei Folgerungen gezogen werden:

- 1.) Die Einheitlichkeit der Substanz, durch Elektrophorese (6) und Untersuchungen in der Ultrazentrifuge^{+) (111, 112) schon wahrscheinlich gemacht, wird bestätigt.}
- 2.) Die Bariumhydroxyd-Fällungsmethode ist geeignet, den Schleim unter Umgehung der zeitraubenden und verlustreichen Fällungsmethoden sauber zu gewinnen.

^{+) Die Einheitlichkeit der Substanz konnte durch die Sedimentationsdaten in der Ultrazentrifuge bewiesen werden. Verunreinigungen von Molekulargewichten > 10 000 sind mit Sicherheit auszuschließen. Auch die von H. J A N E C K E und W. K E H R nach physikalischen und chemischen Methoden bestimmten Molekulargewichte (6) konnten durch dieses Verfahren bestätigt werden. Die Sedimentationsmessung verschiedener Schleimkonzentrationen unter Annahme des partiellen spezifischen Volumens für Polyzucker (109) ergaben ein Molekulargewicht von 4100 ± 5.}

Die Untersuchungen wurden von der Firma Beckman Instruments GmbH., München, durchgeführt, wofür auch an dieser Stelle gedankt sei.

3.3 Qualitative und quantitative Bausteinanalyse

Nach Hydrolyse des Polymers können die Zuckerbestandteile qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Die verschiedenen Hydrolyseverfahren und ihre Einwirkung auf die entstehenden freien Zucker sind in einer früheren Arbeit schon untersucht worden (6).

Nach Hydrolyse und Neutralisation konnten folgende Zucker papierchromatographisch identifiziert werden: Glukuronsäure, Xylose, Arabinose, Galaktose, Glukose und Spuren von Rhamnose. Außerdem konnte als schwer hydrolysierbares Spaltstück eine Aldobiuronsäure gefunden werden, deren erneute Hydrolyse Glukuronsäure und Xylose lieferte +).

Die Hexuronsäure wurde in der älteren Arbeit durch Rundfilterchromatographie als Galakturonsäure erkannt (6). Dieses Ergebnis konnte nicht bestätigt werden. Es handelt sich offenbar um Glukuronsäure, wofür folgende Ergebnisse sprechen:

1.) Nach Hydrolyse des O-Methylschleims konnte papierchromatographisch eindeutig nach Farbe und R_{TMG} -Wert ++ (0,87) Tri-O-methylglukuronsäure identifiziert werden. Der R_{TMG} -Wert stimmt mit von anderen Autoren gemessenen Werten überein, während der R_{TMG} -Wert einer Tri-O-methylgalakturonsäure viel niedriger liegt (80).

2.) Im mit Ionenaustauscher neutralisierten Schwefelsäure-Hydrolysat konnte durch papierchromatographische

+) Aldobiuronsäuren, die aus den gleichen Bausteinen bestehen, sind auch bei der Untersuchung von Chiclegummi (118), von Chagualgummi (119) und von Haferschalen-Hemicellulose (149) gefunden worden.

++) Der R_{TMG} -Wert ist ein Maß für die papierchromatographische Wanderung eines O-Methylzuckers, bezogen auf 2,3,4,6-Tetra-O-methylglukose.

Untersuchungen (107) im Pyridin-Essigester-Eisessig-Wasser-Gemisch (5:5:1:3) die Anwesenheit von Glukuronsäure bestätigt werden ($R_{\text{Glukose}} = 0,4$).

Die Glukuronsäure ist in mit Bariumkarbonat neutralisierten Hydrolysaten durch die geringe Löslichkeit des Bariumglukuronats schwierig nachzuweisen, was durch Austauscherneutralisation oder durch enzymatische Spaltung des Moleküls umgangen werden kann.

Zur quantitativen Bestimmung der Zuckerbestandteile nach Hydrolyse, papierchromatographischer Trennung und Elution soll hier nicht das schon benutzte photometrische Verfahren (6) nach J. K. N. J O N E S und J. B. P R I D H A M (10), sondern als Ergänzung dazu die quantitative Perjodatoxydation benutzt werden.

E. L. H I R S T und J. K. N. J O N E S untersuchten die Reaktion des Perjodats mit den verschiedenen Zuckertypen und legten genaue Analysenbedingungen mit unterschiedlichen Reaktionszeiten bei den einzelnen Zuckern fest (11). Die totale Perjodatoxydation von Monosacchariden, die als Endprodukt neben Formaldehyd Ameisensäure liefert, läuft je nach der C-Zahl und der Art der funktionellen Gruppe an C_6 unterschiedlich. Neben den anderen evtl. frei werdenden Spaltprodukten ($HCHO$, CO_2 , CH_3CHO) entstehen pro Mol Hexose und Hexuronsäure 5 Mol und pro Mol Pentose bzw. Rhamnose 4 Mol Ameisensäure, die titrimetrisch bestimmt werden kann.

Um genaue Dosierung auf dem Papier zu vermeiden und Verluste während Neutralisation, papierchromatographischer Trennung und Elution auszugleichen, wurde als Bezugzucker vor der Neutralisation ein im Polysaccharidmolekül nicht vorhandener Zucker - in diesem Falle Ribose - zugesetzt (12).

Nach dem Mittelwert aller quantitativen Bestimmungen besteht der Schleim aus:

45%	Glukuronsäure
21%	Xylose
10%	Arabinose
15%	Galaktose
7%	Glukose
2%	Rhamnose.

Die Werte liegen in guter Übereinstimmung mit den nach dem photometrischen Verfahren gefundenen Ergebnissen (6), wenn auch geringe Abweichungen vorhanden sind. Als genaueres Verfahren ist wohl die Perjodatspaltung anzusehen; die Ergebnisse dieser quantitativen Bestimmung werden daher allen Betrachtungen zugrunde gelegt.

Aus diesen Ergebnissen folgt auch die Identität der vom W. K E H R (6) benutzten Substanz mit dem in dieser Arbeit zur Untersuchung vorliegenden Material, was auch papierchromatographische Untersuchungen der beiden Substanzen und Mischproben beweisen. Die Ergebnisse der älteren Arbeit können also auch für das hier benutzte Polysaccharidmaterial als gegeben angesehen werden.

3.4 Physikalisch-chemische Methoden zur Strukturaufklärung von Polysacchariden.

Zwei physikalisch-chemische Methoden, die bisher mit Erfolg in der Polysaccharidforschung eingesetzt wurden, sind wichtig zur Bestimmung der Konfiguration der glykosidischen Bindung: Die Messung der IR-Absorption und der Dielektrizitätskonstante.

3.4.1 Die IR-Absorption

S.A. B A R K E R und Mitarbeiter (14) sowie L.P. K U H N (15), der die Absorptionsspektren von 79 Kohlenhydraten aufnahm, wiesen auf einige Besonderheiten im Absorptionsspektrumbereich von 11 bis 19μ hin. Der kurzwelligere Bereich ($2 - 11\mu$) ist in struktureller Hinsicht uninteressant und zeigt die für die funktionellen Gruppen charakteristischen Absorptionsmaxima.

Folgende Unterscheidungen struktureller Art sind möglich:

a) Unterscheidung des glykosidischen Bindungstyps (Meßbereich $13 - 15\mu$): α -glykosidisch gebundene Glukopyranose zeigt ein Absorptionsmaximum bei $844 \pm 8 \text{ cm}^{-1}$ (Wellenzahl), während das Maximum von β -Glukopyranoside in den langwelligeren Teil verschoben ist ($891 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$).

Diese Maxima sind auch bei Amylose bzw. Cellulose zu finden, was die Anwendungsmöglichkeit dieses Verfahrens für Homoglykane zeigt.

b) Unterscheidung zwischen Furanosen und Pyranosen: Bei der Messung von vielen Furanosiden konnten verschiedene Absorptionsmaxima (2924 ± 13 ; 879 ± 7 ; 858 ± 7 und 799 ± 17) beobachtet werden, was eine Möglichkeit zur Erkennung von furanoiden Hemiacetalen bietet.

Das Absorptionsspektrum des Kamillenschleims zeigt im strukturell uninteressanten Teil eine Verschiebung der OH-Valenzschwingung in den langwelligen Bereich (3μ) was auf Assoziation (H-Brückenbindung) zurückzuführen ist (16). Eine Unterscheidung der Hemiacetalringtypen war nicht möglich, doch ist ein Maximum bei 890 cm^{-1} ($11,25\mu$) vorhanden, was auf β -glykosidische Bindung hinweist. Eine Vergleichsmessung von Gummi arabicum ergab keine neuen Anhaltspunkte; auch hier ist das durch β -glykosidische Verknüpfungen entstehende Maximum nicht stärker ausgeprägt, obwohl eine 3- β -D-Galaktosido-D-Galaktose (108) und die Aldobiuronsäure 6- β -D-Glukuronsido-D-galaktose (113, 114) isoliert werden konnten; über die Konfiguration der übrigen glykosidischen Bindungen in Gummi arabicum ist noch wenig bekannt. Das für α -Glykoside typische Absorptionsmaximum, das im Kamillenschleim-Spektrum nicht vorhanden ist, ist jedoch im Gummi arabicum-Spektrum deutlich ausgeprägt.

Es ist noch nicht entschieden, ob man die Ergebnisse von S. A. B A R K E R (14) und von L. P. K U H N (15), die mit Homoglykanen gearbeitet haben, auf Heteroglykane anwenden kann. Neuere Arbeiten, die insbesondere die Cellulose- und Chitinbrückenbindungen zum Gegenstand haben,

zeigen die Möglichkeiten auf, die in dieser Methode liegen (100, 150, 151).

3.4.2 Die Dielektrizitätskonstante

Ein anderes Unterscheidungsmerkmal zwischen Polymeren, die durch α - bzw. β -glykosidische Verknüpfung der Monomeren entstanden sind, ist die Dielektrizitätskonstante. F. O E H M E hat bei DK-Messungen von Di- und Polysacchariden, die α - bzw. β -glykosidische Bindungen enthalten, bemerkenswerte Unterschiede festgestellt (17).

α -Glykoside scheinen sich - im Gegensatz zu den β -Glykosiden- im elektrischen Wechselfeld dipolartig orientieren zu können, was eine hohe DK zur Folge hat.

F. O E H M E fand bei α -Glykosiden eine DK von 9 - 9,5 (Stärke, Dextran, Maltose) und bei β -Glykosiden eine DK von 2 - 2,3 (Cellulose, Saccharose, Laktose).

Die nach der Immersionsmethode nach H. S T A R K E (18) gemessenen und graphisch ermittelten DK-Werte des Kamillenschleims und verschiedener Kohlenhydrate ergaben eine gute Übereinstimmung mit den von F. O E H M E nach der Pulvermethode gefundenen Werten.

DK _{Stärke-Laktose}	= 9,0	DK _{Cellulose}	= 2,0
DK _{Stärke}	= 9,0	DK _{Schleim}	= 2,4
DK _{Maltose}	= 9,2	DK _{Laktose}	= 3,5

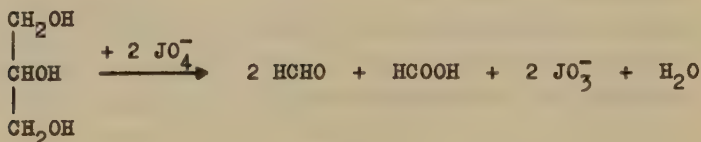
Die Dielektrizitätskonstante des Schleims beträgt 2,4 . Damit wird das Ergebnis der IR-Absorptionsmessung bestätigt: Die β -glykosidische Bindung ist im *Matricaria chamomilla* - Schleim vorherrschend oder allein vorhanden.

Da die Dielektrizitätskonstanten von α - und β -glykosidischen - aus Pentosen bestehenden - Oligo- und Polysacchariden noch nicht gemessen wurden, kann die Aussage nicht eindeutig sein, obwohl die Zuckerkomponenten keinen wesentlichen Einfluß auf die Dipolorientierungsmöglichkeiten eines Moleküls haben dürften.

3.5 Chemische Methoden zur Strukturaufklärung von Polysacchariden

3.5.1 Die Perjodatoxydation

Die α -Glykolspaltung durch Perjodsäure und ihre Salze bei gleichzeitiger Reduktion des Perjodats zu Jodat wurde zuerst von L. M A L A P R A D E im Jahre 1928 beobachtet (19).



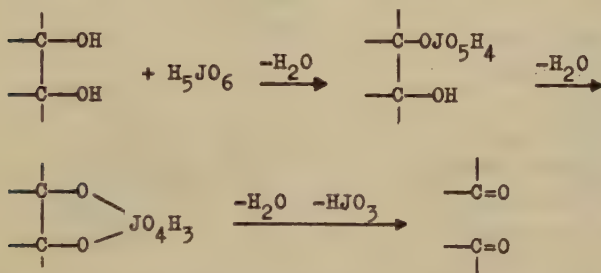
Aus der primären alkoholischen Gruppe entsteht Formaldehyd, aus der sekundären alkoholischen Gruppe Ameisensäure. Die Anwendung blieb nicht auf α -Glykole beschränkt: α -Hydroxyaldehyde, -Ketoaldehyde, -Aminoalkohole, -Ketole, -Diketone, -Dialdehyde können ebenfalls durch Perjodat oxydiert werden.

Eine Übersicht über die Perjodatoxydationen, die sich gegenüber der Bleitetraacetatspaltung durch ihre Selektivität auszeichnen, und ihre Anwendungsmöglichkeiten in der analytischen und synthetischen organischen Chemie gibt E. L. J A C K S O N (20).

Im Rahmen dieser Arbeit interessieren nur die Anwendung der Perjodatoxydation in der Kohlenhydratchemie (21, 22) und insbesondere die Möglichkeiten zur strukturellen Aufklärung eines Polysaccharidmoleküls. Außer zur Strukturuntersuchung von Mono-, Oligo- und Polysacchariden sowie von Glykosiden kann die Perjodatoxydation zur quantitativen Bestimmung von Zuckern (s. Seite 20), zum Nachweis von Zuckern allgemein (23), zum Nachweis von Desoxyzuckern (24) und zur Synthese von partiell methylierten Zuckern (25) eingesetzt werden.

3.5.1.1 Reaktionsmechanismus und allgemeine Bedingungen

R. C R I E G E E deutet die Reaktion ähnlich wie die Bleitetraacetatspaltung. Als Reagens wirkt - auch bei Natriummetaperjodatoxydation - die o-Perjodsäure, wobei intermediär zyklische o-Perjodsäureester auftreten (26).



Die zyklischen Perjodsäureester, obwohl noch nicht isoliert, müssen angenommen werden, da cis α -Glykole schneller gespalten werden als trans α -Glykole.

Da sich der cis α -Glykol-Perjodsäureester bevorzugt und schneller bilden wird, wird auch die Spaltung von cis α -Glykolen schneller verlaufen als die der trans α -Glykole (27). Als Oxydationsmittel können neben der o-Perjodsäure auch die Natrium- und Kaliumsalze der Metaperjodsäure benutzt werden. Wegen der besseren Löslichkeit des Natriummetaperjodats in schwach saurer Lösung wird dem Natriumsalz im Rahmen dieser Arbeit der Vorzug gegeben.

Man muß bei den Perjodatoxydationen von Polysacchariden zwei Oxydationsstufen unterscheiden:

1.) Die selektive Perjodatoxydation

Hierbei vollzieht sich lediglich die Spaltung der C - C Bindung mit den beiden funktionellen Gruppen. Nur diese erste Stufe erlaubt Aussagen über den strukturellen Bau eines Moleküls (Abb.1).

2.) Die totale Oxydation (Überoxydation)

Die Überoxydation besteht in der Weiteroxydation des bei der selektiven Spaltung entstandenen Oxydations-

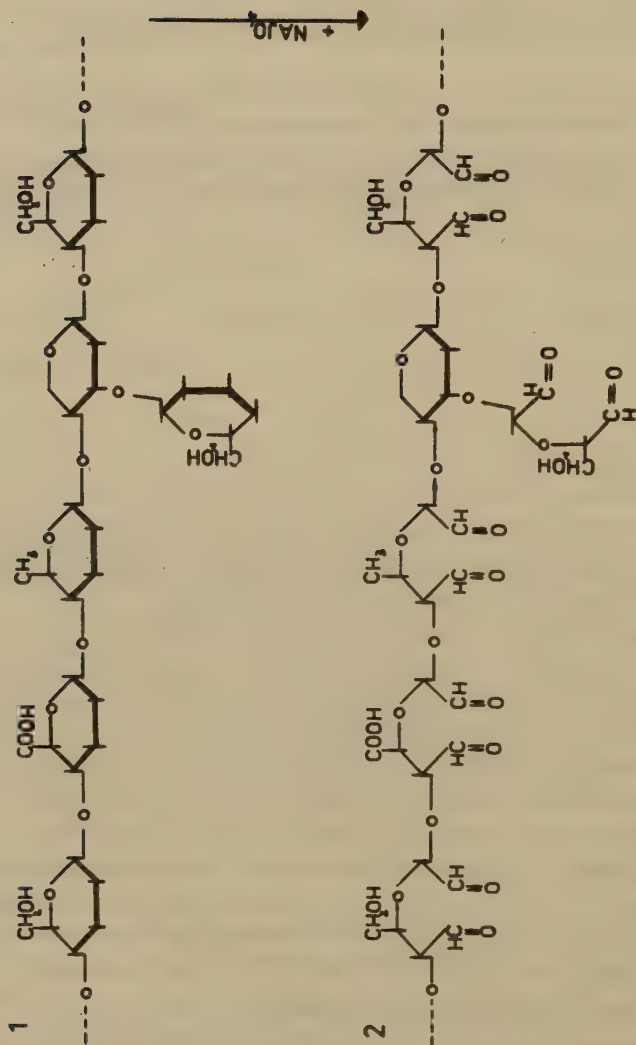
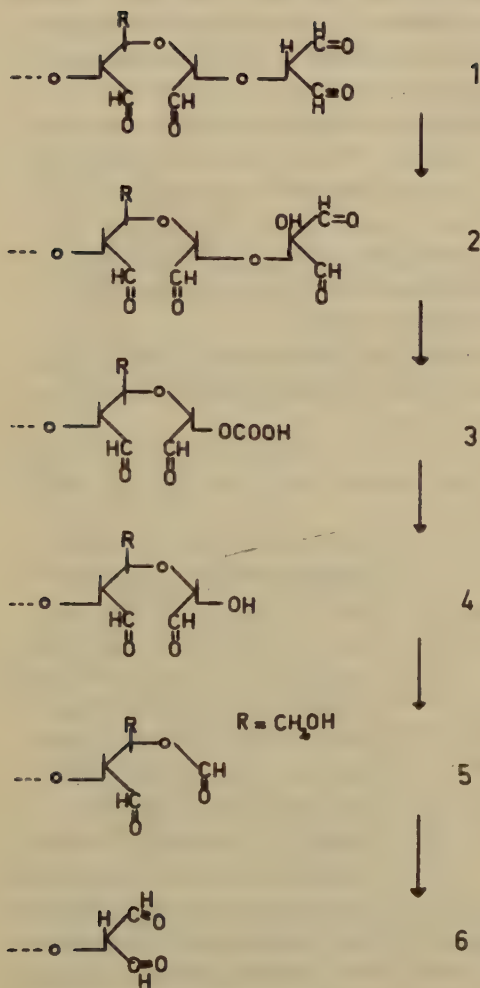


Abb. 1

Selektive Perjodatspaltung eines verzweigten Polysaccharids mit Hexose-, Pentose-, Rhamnose- und Hexuronsäureanteilen (1) und das entstandene Oxoprodukt (2).

Abb. 2

Überoxydation der aus der reduzierenden Endgruppe eines 1,4 Glukans entstandenen Produkte.



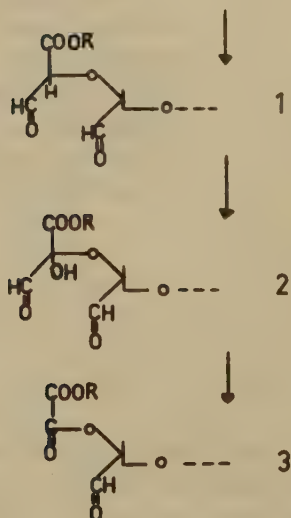
Durch den aktiven Wasserstoff entsteht aus dem Dialdehyd (1) der Hydroxyaldehyd (2), der dann über das Zwischenprodukt (3) zu dem α -Hydroxyaldehyd (4) gespalten wird.

Durch weitere Peroxydation entsteht der O-Formylester (5), aus dem sich nach O-Formylesterspaltung und Oxydation von C_6 zu Formaldehyd der Dialdehyd (6) bildet, der dem Dialdehyd (1) entspricht und nur um eine Zuckereinheit kleiner ist.

produkts. Hierbei kann das primär entstandene Spaltprodukt entweder nach Entstehung von neuen funktionellen Gruppen (z.B. durch Hydrolyse der primär aus reduzierenden Endgruppen sich bildenden O-Formylester), oder nach Entstehung von aktivierten Methylen-
gruppen (z.B. bei primär aus nichtreduzierenden Hexuronsäureendgruppen resultierenden Dialdehyden) weiteroxydiert werden.

Insbesondere die Endglieder sind Überoxydationsempfindlich. Am reduzierenden Endglied ergeben sich im Falle eines 1,4 Glukans folgende Stufen der Oxydation (28):

- a) Sprengung des Pyranrings, wobei C_2 in Form von Ameisensäure freigesetzt wird. (Selektive Spaltung)
- b) Verseifung des O-Formylesters.
- c) Weitere Oxydation der entstandenen α -Glykol-Verbindung, wobei C_6 abgespalten und Formaldehyd frei wird.
- d) Der entstandene Dialdehyd aktiviert nun den Wasserstoff an C_4 , und eine weitere Oxydation (Abb.2) kann eintreten.



Ein weiteres Beispiel für Überoxydation, die durch Luft, Licht und alkalische Reaktion beschleunigt wird, zeigt Abb.3. Das nichtreduzierende Hexuronsäureendglied wird primär unter Abspaltung von C_3 als $HCOOH$ zum Dialdehyd oxydiert (Stufe 1). Auch hier tritt nun eine H-Aktivierung, bedingt durch die Nachbarschaft der beiden Carbonylgruppen, ein, wodurch weitere Oxydation eintreten kann (Stufe 2 und 3).

Abb. 3

Es ist wichtig für Konstitutionsaufklärungen, daß das Ende der selektiven Spaltung erkannt wird, denn nur in ihrem Endpunkt können Aussagen struktureller Art gemacht werden. Im allgemeinen verläuft die selektive Spaltung schnell und die Überoxydation langsam, so daß aus dem Gesamtablauf der Reaktion das Ende der selektiven Spaltung graphisch erkannt werden kann. Für den glatten Verlauf der Perjodatoxydation - möglichst ohne Überoxydation - sind verschiedene Bedingungen von Bedeutung:

Temperatur

Die Reaktion läuft bei Zimmertemperatur glatt ab. Zur Ausschaltung von Überoxydationsreaktionen und von sekundären Oxydationen (d.h. Oxydationen der entstandenen niedrigen Aldehyde und Säuren) ist niedrigere Versuchstemperatur vorgeschlagen worden (29). Da aber bei niedriger Temperatur die Löslichkeit des Natriummetaperjodats sinkt und Vorversuche bei niedrigen Temperaturen keine anderen Ergebnisse brachten, wurde Zimmertemperatur als Reaktionstemperatur benutzt.

pH-Wert und Puffer

Im allgemeinen sind bei pH 3-5 die Bedingungen für die selektive Spaltung optimal. Bei pH > 5 treten Überoxydationen und Nebenreaktionen ein (30), was A. L. P O T T E R und W. Z. H A S S I D bei Amylose-Untersuchungen bestätigten (31). Pufferung ist oft vorgeschlagen worden, um die entstehenden Säuren oder Basen (HCOOH , NH_3) auszuschalten. Vorversuche ergaben keine Notwendigkeit, in Puffersystemen zu arbeiten, da mit Anfangs-pH-Werten von 4-5 die H-Ionenkonzentration im Laufe der Gesamtreaktion nur auf pH 4-3,5 stieg. Der für die Reaktion optimale pH-Bereich wird also nicht unterschritten.

Konzentration der Perjodatlösung

In Vorversuchen erwies sich eine 0,01-0,015 m NaJO_4 -Konzentration am günstigsten. Konzentrationen > 0,1 m lassen die Reaktion zu schnell verlaufen, so daß schlechte Kontrollmöglichkeit besteht (22).

Zeit

Wie alle Ergebnisse zeigen, ist nach 50 bis 100 Stunden

mit Sicherheit das Ende der selektiven Spaltung erreicht. Die Reaktion läuft zwar weiter, sie ist aber offenbar durch Überoxydation bedingt. Alle Versuchsansätze wurden im Bereich von 0 bis 200 Stunden verfolgt.

Licht

Lichtausschluß ist Hauptbedingung zur Erreichung einer gezielten Oxydation. Lichteinwirkung begünstigt Überoxydation (32), Ozonbildung und Oxydation der Spaltprodukte Ameisensäure und Formaldehyd (33). Bei Versuchen unter Lichtausschluß dagegen erfolgt keine Oxydation der entstandenen Oxydationsprimärprodukte (34).

Periodatüberschuß

Ein Überschuß ist notwendig, da sich sonst die Reaktion über Tage und Wochen hinzieht (35). Ein Überschuß von 3-5 Mol NaJO_4 pro Anhydrozuckereinheit (= AZE)⁺ erwies sich als am günstigsten. Unterschwellige NaJO_4 -Mengen (< 3 Mol NaJO_4 /AZE) ließen keine Erkennung des selektiven Oxydationsendpunktes zu.

Lösungsmittel

Als Lösungsmittel bietet sich wegen der guten Wasserlöslichkeit des Kamillenschleims Wasser an, obwohl auch in anderen Lösungsmitteln, Mischungen oder Emulsionen erfolgreich gearbeitet werden kann (36).

Alle Versuche wurden in Reihen unter Veränderung der verschiedenen Bedingungen, doch in folgenden Bereichen durchgeführt:

Temperatur	: 20-25°C
pH-Wert	: 4-5
NaJO_4 -Konzentration	: 0,01-0,015 m
Überschuß NaJO_4	: 3-5 Mol pro Anhydrozuckereinheit
Polysaccharidkonzentration	: 0,05-0,1% in wässriger Lösung.

⁺) Aus der quantitativen Zuckerbestimmung errechnet sich ein mittleres Zuckeranhydridgewicht von 158, das allen Berechnungen zugrunde gelegt ist.

3.5.1.2 Endgruppenbestimmung durch Ameisensäureanalyse

Normale Kettenglieder (Abb.6) können nach Perjodatoxydation keine Ameisensäure bilden (Ausnahme: 1,6-gebundene Hexosen).

Doch aus reduzierenden und nichtreduzierenden Endgruppen kann die Perjodsäure Ameisensäure freisetzen:

Am reduzierenden Endglied (Abb.5) wird Ameisensäure gebildet, wenn auch in unterschiedlichen Mengen (Ausnahmen sind 1,2-gebundene Pentofuranosen und -pyranosen, die bisher in Naturstoffen noch nicht gefunden wurden).

Am nichtreduzierenden Endglied (Abb.4) wird im Falle von Hexo- und Pentopyranosen immer pro Mol Endglied ein Mol Ameisensäure frei. Nichtreduzierende Pentofuranose-Endglieder werden ohne HCOOH-Bildung gespalten.

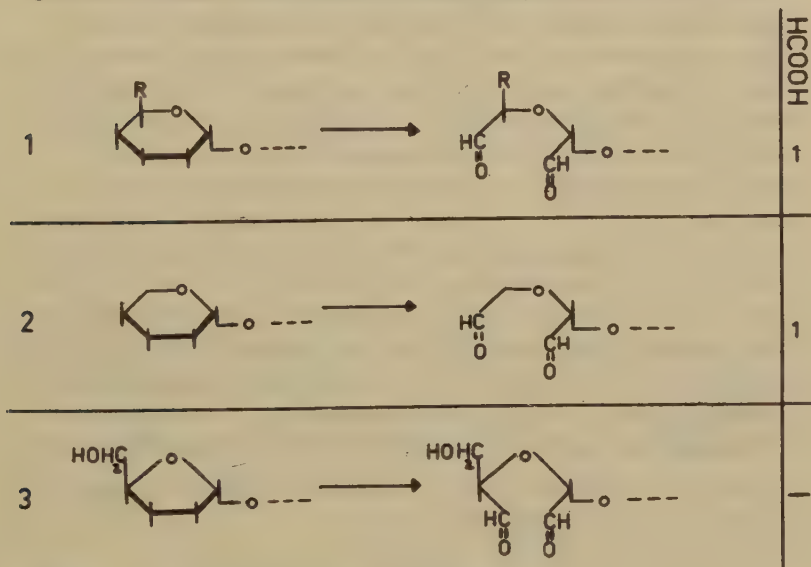


Abb.4

Selektive Perjodatspaltung nichtreduzierender Endglieder.

Hexose, Hexuronsäure und Rhamnose (1)

Pentopyranose (2)

Pentofuranose (3)

Da pro Molekül Polysaccharid nur ein reduzierendes Endglied vorhanden ist, kann in verzweigten Molekülen die Ameisensäurebildung aus der reduzierenden Endgruppe gegenüber der Menge HCOOH , die aus den vielen nichtreduzierenden Endgliedern entsteht, vernachlässigt werden. In linearen oder schwach verzweigten Molekülen dagegen muß die aus dem reduzierenden Endglied frei werdende Ameisensäure berücksichtigt werden.

Bei verzweigten Polysacchariden sind daher die während der selektiven Perjodatspaltung frei werdenden Mol Ameisensäure pro Anhydrozuckereinheit ein Maß für den Endgruppengehalt des Moleküls.

Die entstandene Ameisensäure kann nach verschiedenen Methoden bestimmt werden. Die Sublimatmethode (37), die jodometrische Methode (38, 39), die Mikromethode in der Warburg-Apparatur (30) und die acidimetrische Methode sind mit Erfolg benutzt worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das acidimetrische Verfahren gewählt, das schnell arbeitet und laufend Untersuchungen ermöglicht. Der NaJO_4 -Überschuß muß vorher durch Glykol-Zugabe zerstört werden.

Über die Bestimmung des Endpunktes der Titration bestehen unterschiedliche Ansichten. M. MORRISON, J.ORTON und A.C. KÜPPER (34), die Maltose und Saccharose nach Perjodatoxydation acidimetrisch bestimmten, finden beim Endpunkt pH 6 nur 80-90% des theoretischen Ameisensäurewertes, während am Titrationsendpunkt pH 8 (mit Phenolphthalein als Indikator) genaue Werte bei ungenauem Um-

In Abb. 5 und 6 bedeuten:

- | | | |
|----|-----|---|
| 1. | 1,4 | Polyhexosen, Polyhexuronsäuren bzw. Polyrhannosen |
| 2. | 1,3 | |
| 3. | 1,6 | |
| 4. | 1,4 | Polypentopyranosen |
| 5. | 1,3 | |
| 6. | 1,2 | |
| 7. | 1,3 | Polypentofuranosen. |
| 8. | 1,2 | |
| 9. | 1,5 | |

				HCHO	HCOOH
			1	2	1
			2	1	1
			3	3	-
			4	2	-
			5	1	1
			6	-	-
			7	1	1
			8	-	-
			9	2	-

Abb.5 Perjodatspaltung von reduzierenden Endgliedern

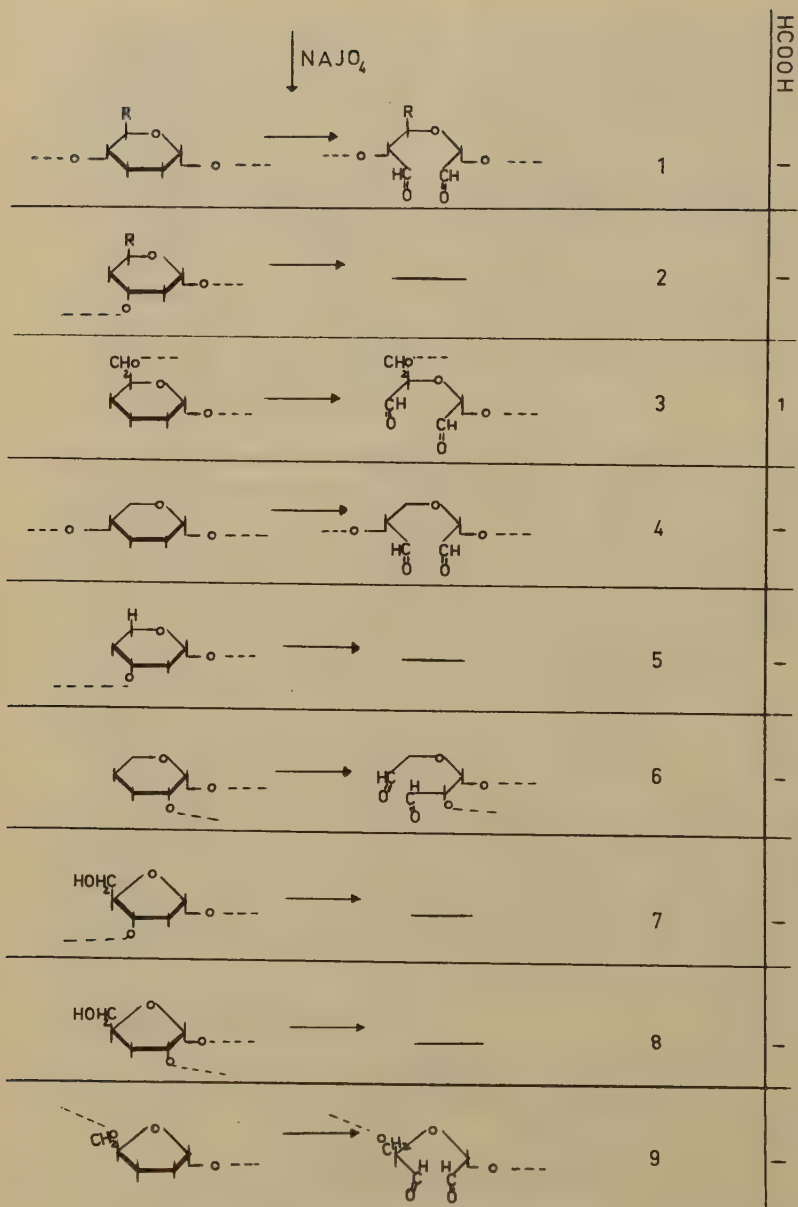


Abb. 6 Perjodatspaltung von Kettengliedern

schlag erhalten werden. Sie schlagen deshalb Titration bis pH 6 (Methylrot als Indikator) und Korrektur des Ergebnisses mit einem Maltose-Vergleichswert vor.

Da mehr Wert auf einen scharfen Umschlag gelegt wird, ist die Benutzung von Methylrot als Indikator vorteilhafter, obwohl von anderen Autoren auch bei Verwendung von Phenolphthalein gute Werte erzielt werden konnten (40). Außerdem liegen sowohl die mit Phenolphthalein als auch mit Methylrot bestimmten Säurewerte in einem Bereich, der noch nicht die Fehlerbreite des Verfahrens an sich besitzt (siehe Abb.7).

Bei der HCOOH-Bestimmung im Perjodat-behandelten Kamilenschleim war bei allen Versuchen der Knickpunkt der Kurve - offenbar der Endpunkt der selektiven Spaltung - gut erkennbar. Eine Ausnahme bilden, wie Abb.8 zeigt, die Kurven der Oxydationen, die mit geringem NaJO_4 -Überschuß erhalten wurden und keinen Knickpunkt bilden. Wie aus der typischen HCOOH-Bildungskurve (Abb.8) und dem Gesamtkurvenbild (Abb.9) hervorgeht, bewegt sich die Ameisensäurebildung zwischen 0,23 und 0,27 Mol pro Anhydrosacharideinheit (AZE), was einem Endgruppengehalt von 23-27% entspricht.⁺)

Die Kurven lassen sich in drei Abschnitte einteilen:

- 1.) Zwischen 0 und 20 Stunden verläuft die Reaktion schnell bis zum Knickpunkt der Kurve. Die HCOOH-Bildung ist proportional dem NaJO_4 -Verbrauch.
- 2.) Zwischen 20 und 60 Stunden läuft die Reaktion langsamer ab. Der Knickpunkt in dem Bereich von 0,23 bis 0,27 Mol HCOOH pro Anhydrosacharideinheit ist erreicht. Dieser Bereich ist in allen Kurven und bei

⁺) Daß ein verzweigtes Molekül vorliegt, geht auch aus dem Verhalten des Schleimes gegenüber kationenaktiven Farbstoffen, z.B. Methylenblau, hervor. Der Schleim ist mit Farbstoffen nicht färbbar, während einige lineare Polysaccharide (z.B. Carragenan) mit diesen Farbstoffen sich zu langen Fäden agglomerieren und ausfallen (115). Die Färbbarkeit hängt aber offenbar auch von anderen Bedingungen ab, z.B. vom Vorhandensein von Sulfatestergruppen oder Anhydrogalaktoseeinheiten (115). Die Frage, inwieweit das λ -Carragenan, der lineare Anteil, an der Fällung beteiligt ist, ist noch nicht endgültig beantwortet.

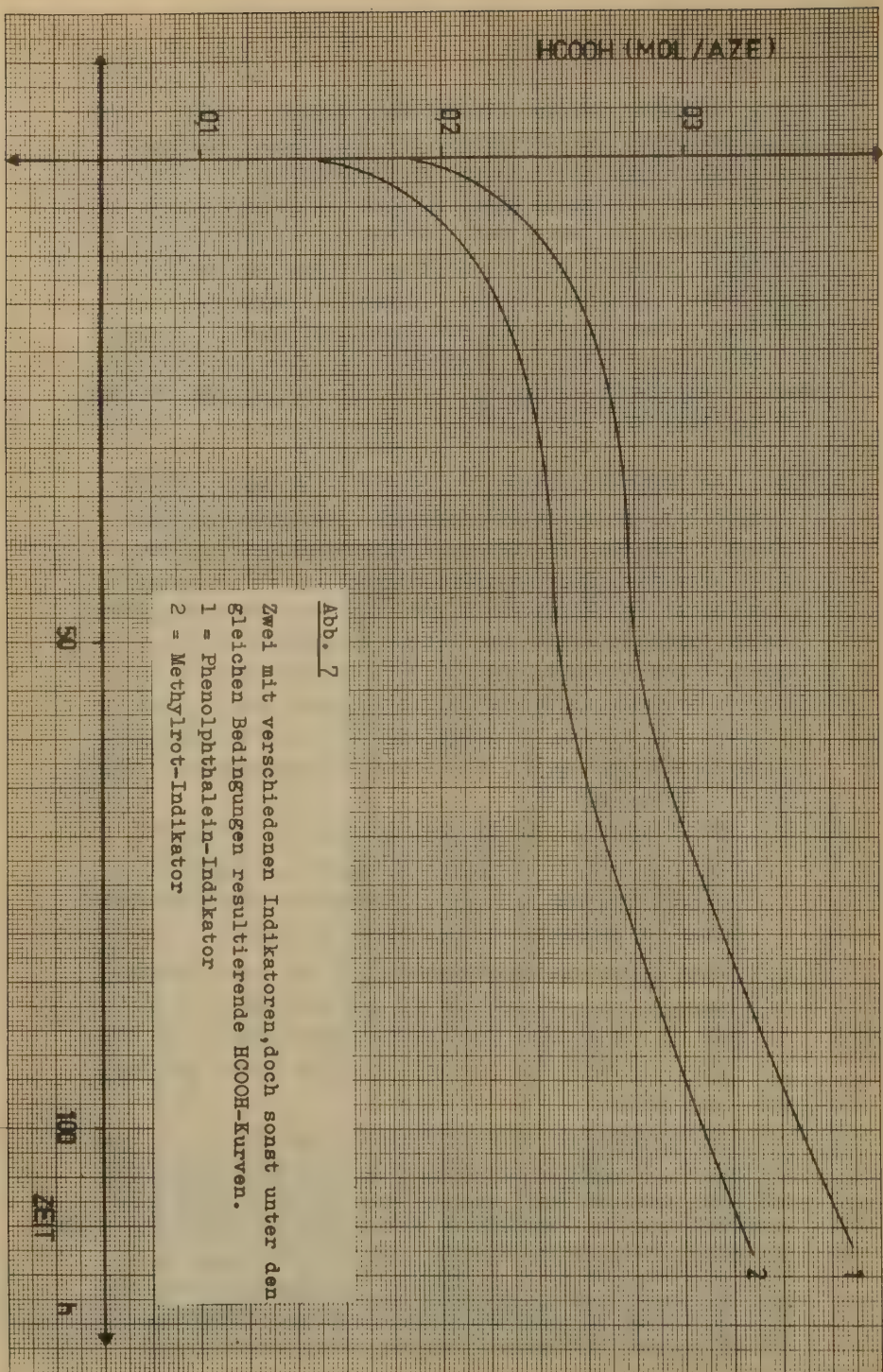


Abb. 7

Zwei mit verschiedenen Indikatoren, doch sonst unter den gleichen Bedingungen resultierende HCOOH -Kurven.

1 = Phenolphthalein-Indikator

2 = Methylrot-Indikator

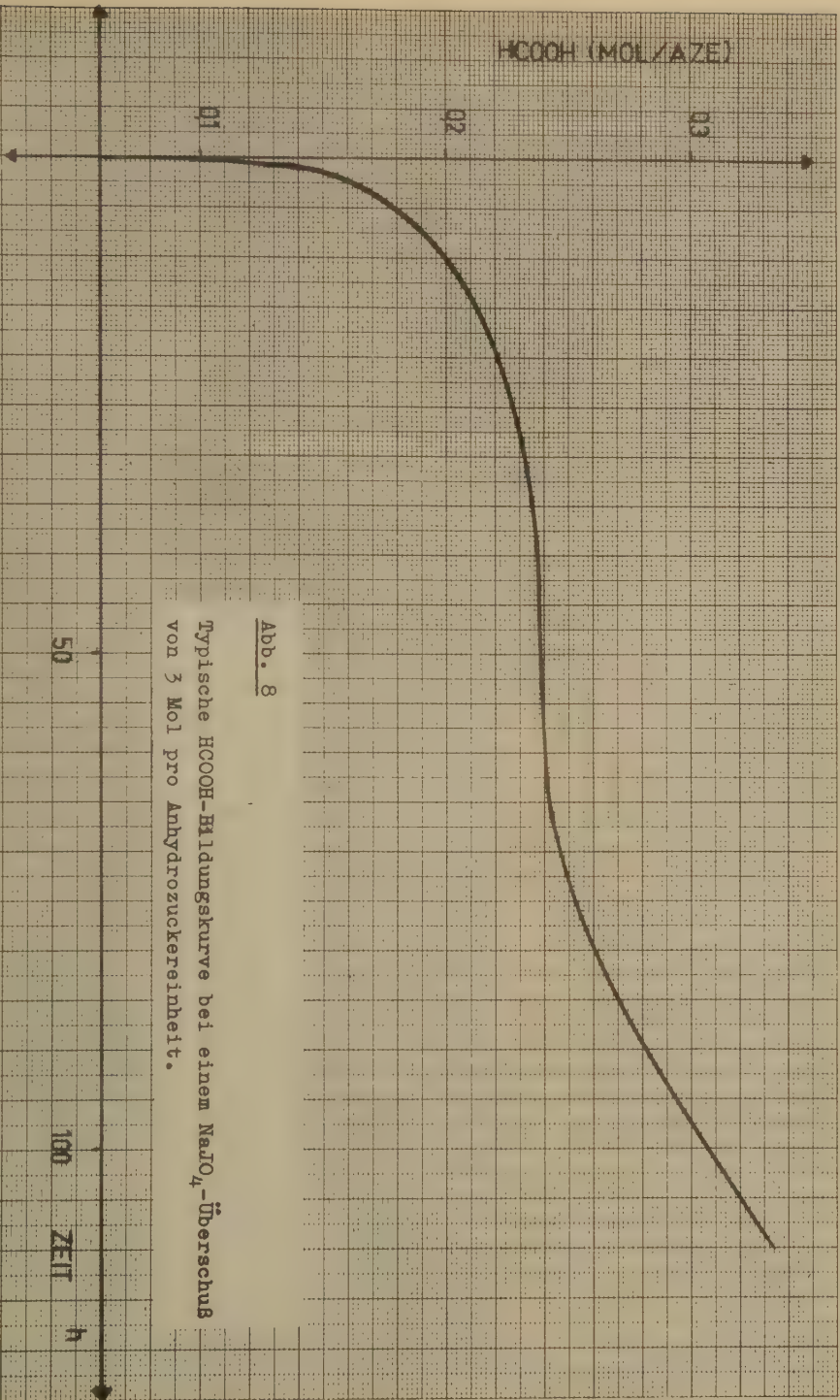
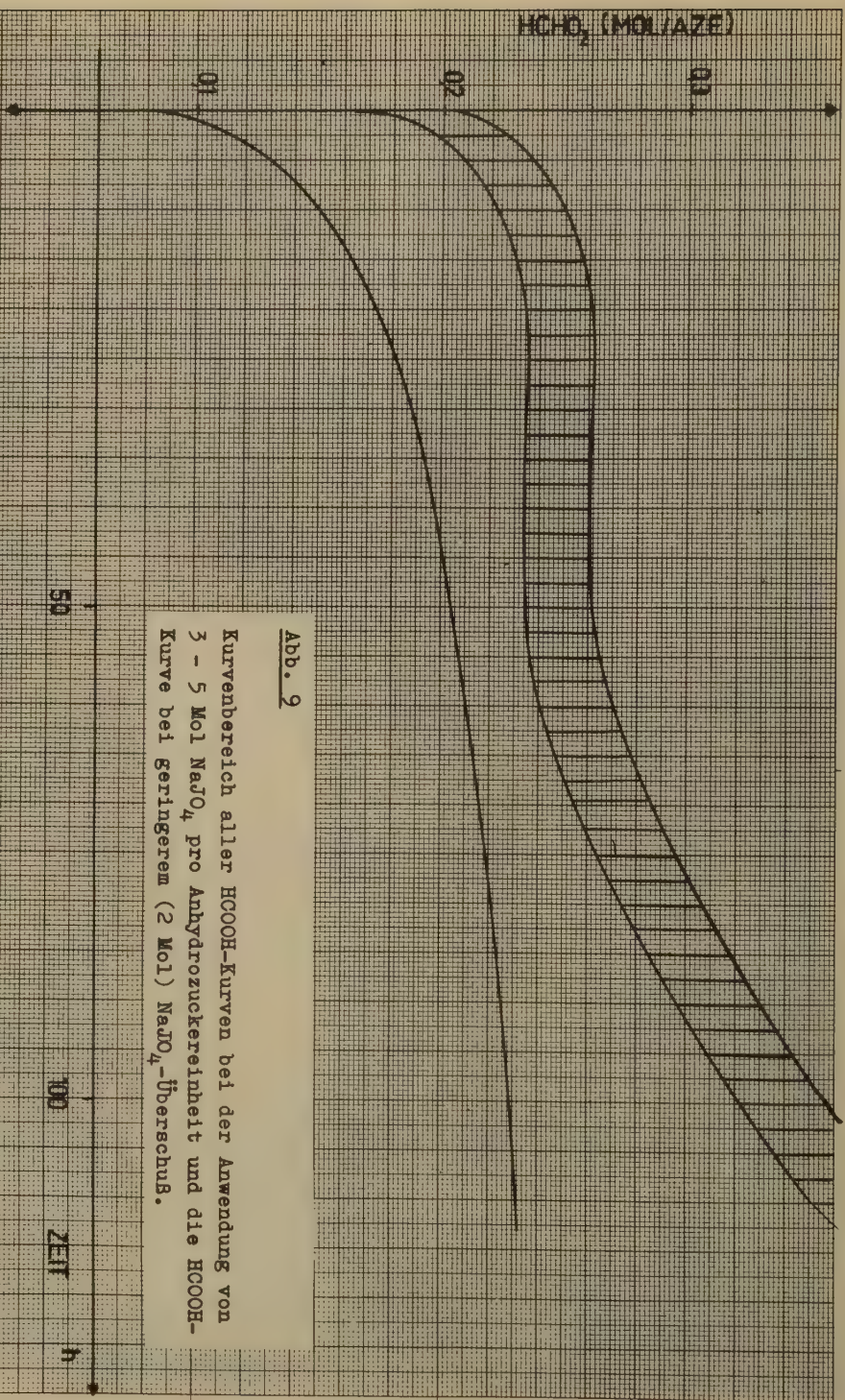


Abb. 8

Typische HCOOH-Bildungskurve bei einem Na_2O_4 -Überschub von 3 Mol pro Anhydrosuckereinheit.



allen angewandten Bedingungen vorhanden, wenn er auch je nach NaJO_4 -Konzentration parallel verschoben ist.

- 3.) Nach 60 Stunden ist das Ende der selektiven Spaltung mit Sicherheit erreicht. Es erfolgt weitere Oxydation (Überoxydation) ohne definiertes Reaktionsende. Sowohl die HCOOH -Bildung als auch der NaJO_4 -Verbrauch steigen weiter an, obwohl die Mengen nicht mehr proportional sind, was auf NaJO_4 -Zersetzung zurückzuführen sein könnte.

3.5.1.3 Endgruppengehaltsbestimmung durch NaJO_4 -Analyse

Bei selektiver Spaltung eines Polysaccharidmoleküls wird je Kettenglied (Abb.6) ein Mol NaJO_4 verbraucht. Ausnahmen davon bilden Hexosen, Pentopyranosen und Pentofuranosen in 1,3- und Pentofuranosen in 1,2-glykosidischer Bindung, die von Perjodat nicht angegriffen werden und Hexosen in 1,6-glykosidischer Verknüpfung, die 2 Mol Natriumperjodat pro Mol Zuckereinheit verbrauchen.

Das reduzierende Endglied (Abb.5) benötigt zur Spaltung unterschiedliche Mengen Perjodat oder bleibt unangegriffen. Wichtig ist es zu wissen, daß bei der Spaltung der nicht-reduzierenden Endgruppen (Abb.4) pro Endglied 2 Mol Perjodat verbraucht werden. Ausnahmen bilden pentofuranosidische nichtreduzierende Endgruppen, die nur 1 Mol NaJO_4 verbrauchen.

Bei der Untersuchung von stark verzweigten Substanzen kann der NaJO_4 -Verbrauch des reduzierenden Endgliedes, da es nur einmal im Molekül vorhanden ist, vernachlässigt werden, so daß die pro Anhydrozuckereinheit verbrauchte Menge Perjodat ein Maß für den Endgruppengehalt darstellt.

Der Perjodatverbrauch wurde nach der Methode von J. L. A. N - G E und P. F. F. L E U R Y (41) bestimmt. Die Methode nach L. M A L A P R A D E (42), Reduktion des Perjodats und Jodats in saurer Lösung durch Jodid und titrimetrische Bestimmung des entstehenden Jods, besitzt wegen der relativ

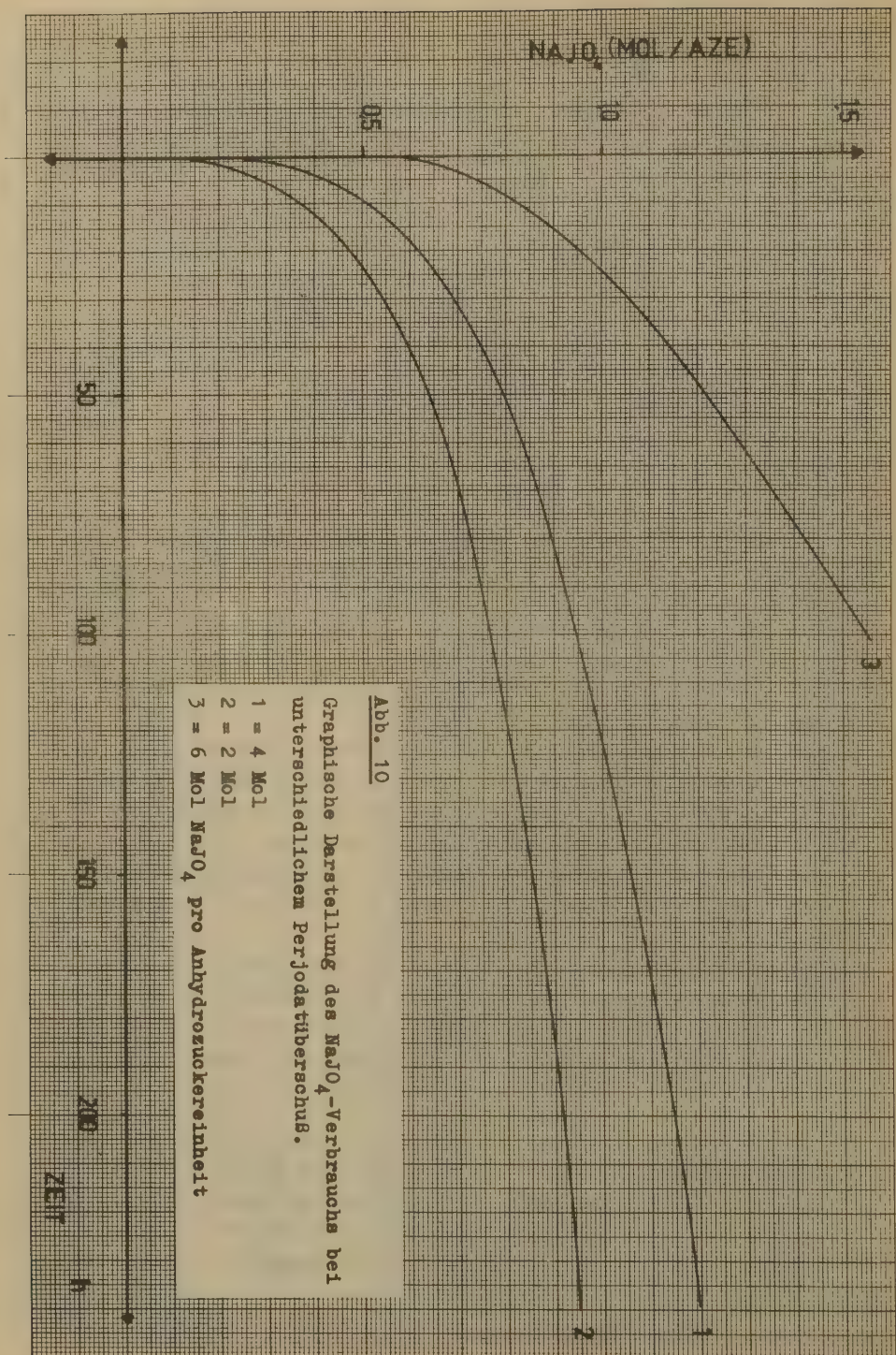


Abb. 10

Graphische Darstellung des Na_2O_4 -Verbrauchs bei unterschiedlichem Peroxidübertrag.

langen Einwirkungszeit des zudem noch flüchtigen Joda Nachteile. Das UV-spektrophotometrische Bestimmungsverfahren (43) ist ebenfalls ungeeignet, weil das JO_4 -Absorptionsmaximum durch die entstehenden Aldehyde gestört wird (44).

Eine andere oft benutzte NaJO_4 -Bestimmungsmethode (103, 104, 105) besteht nach E. M Ü L L E R und O. F R I E D - B E R G E R (106) in einer Reduktion des Perjodats durch Jodid, wobei bei Bikarbonatüberschuß keine Reduktion des Jodats eintritt. Auch hier können Jodverluste durch Substitution, Addition und Flüchtigkeit entstehen, so daß die F l e u r y - L a n g e - Methode (41) wohl die exaktesten Werte liefern dürfte. Sie besteht in einer Reduktion des Perjodats mit arseniger Säure in neutraler bis schwach alkalischer mit Bikarbonat gepufferter Lösung. Unter diesen Bedingungen wird nur das Perjodat-Ion, nicht jedoch das Jodat-Ion reduziert. Der Überschuß an arseniger Säure kann dann jodometrisch bestimmt werden.

Dem Perjodatverbrauch des Kamillen-Polysaccharids bei der Anwendung von 3-6 Mol NaJO_4 pro Anhydrozuckereinheit zeigen die Abbildungen 10 und 11.

Bei den NaJO_4 -Verbrauch-Kurven sind keine typischen Bereiche zu erkennen. HCOOH -Bildung und NaJO_4 -Verbrauch laufen offenbar nur von Reaktionsbeginn bis zum Ende der selektiven Spaltung parallel.

Im Überschußbereich von 3-5 Mol NaJO_4 pro Anhydrozuckereinheit entspricht dem Knickpunkt der Ameisensäurekurven ein Verbrauch von 0,9 bis 1,1 Mol Natriumperjodat pro Anhydrozuckereinheit (Abb.11).

Dieses Ergebnis spricht für ein lineares Polysaccharidmolekül, was aber durch andere Beobachtungen widerlegt ist. Das Vorliegen der Galaktose in 1,3-glykosidischer Bindung, was andere Ergebnisse fordern (siehe S.43), könnte den geringen NaJO_4 -Verbrauch erklären, denn Hexose in 1,3-glykosidischer Bindung bleibt von Perjodat unangegriffen (Abb.6, Nr.2).

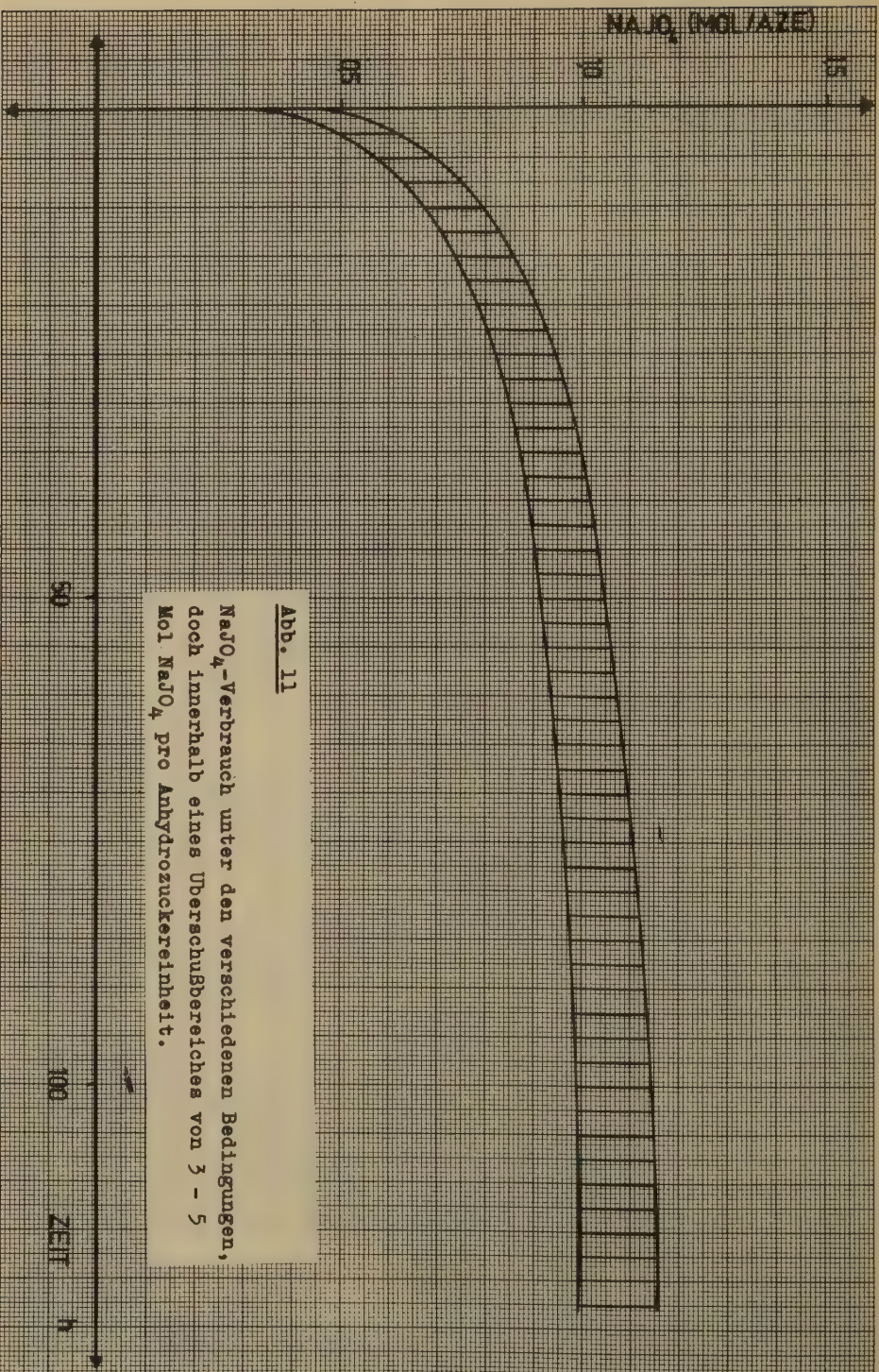


Abb. 11

Na_2O_4 -Verbrauch unter den verschiedenen Bedingungen, doch innerhalb eines Überschubbereiches von 3 - 5 Mol Na_2O_4 pro Anhydrosukereinheit.

3.5.1.4 Verzweigungspunktbestimmung durch Oxoschleimhydrolyse

Nach Zerstörung des Perjodatüberschusses, Dialyse und Hydrolyse des Poly-Dialdehyds lassen sich die Zuckerteile papierchromatographisch identifizieren, die einer Perjodatspaltung nicht zugänglich waren. Ein Nachteil dieser Methode ist durch die relativ hohe NaJO_4 -Konzentration und durch die geringe Oxopolysaccharid-Ausbeute gegeben. Nach einer neueren Arbeit (102) gelang eine fast 100%ige elektrolytische Perjodatoxydation von Stärke, wobei nur 0,1 Mol NaJO_4 pro Anhydroglukoseeinheit eingesetzt wurde.

Von Perjodat werden nicht gespalten:

- 1.) Alle dreifach verknüpften Verzweigungsglieder mit Ausnahme der 1,4,6- oder 1,2,6-gebundenen Hexosen.
- 2.) Pentofuranosen als reduzierende Endglieder, die über C_2 gebunden sind (Abb.5).
- 3.) Kettenglieder in Form von Hexosen, Hexuronsäuren, Pentopyranosen und Pentofuranosen in 1,3- und Pentofuranosen in 1,2-glykosidischer Bindung (Abb.6).

Nach der selektiven Spaltung der Substanz, Entfernung des NaJO_4 -Überschusses, Dialyse, Hydrolyse und papierchromatographischer Trennung konnten Xylose und Galaktose neben Spuren von Uronsäure gefunden werden. Arabinose, Glukose und Rhamnose müßten also in einer Form im Molekül vorliegen, die eine Perjodatspaltung ermöglicht.

Dieser Befund läßt für das Vorliegen von Xylose und Galaktose bzw. Glukuronsäure im intakten Molekül folgende Möglichkeiten zu (Abb.12):

- 1.) Galaktose- bzw. Glukuronsäure-Einheiten liegen im Schleim als Verzweigungspunkte (Abb.12,1) oder als 1,3-gebundene Kettenglieder vor (Abb.12,2).

Da Galaktose in Polysacchariden die 1,3- und 1,6-glykosidische Verknüpfung vorzieht (45), und 1,3-glykosidisch gebunden in Pflanzenschleimen und Hemicellulosen gefun-

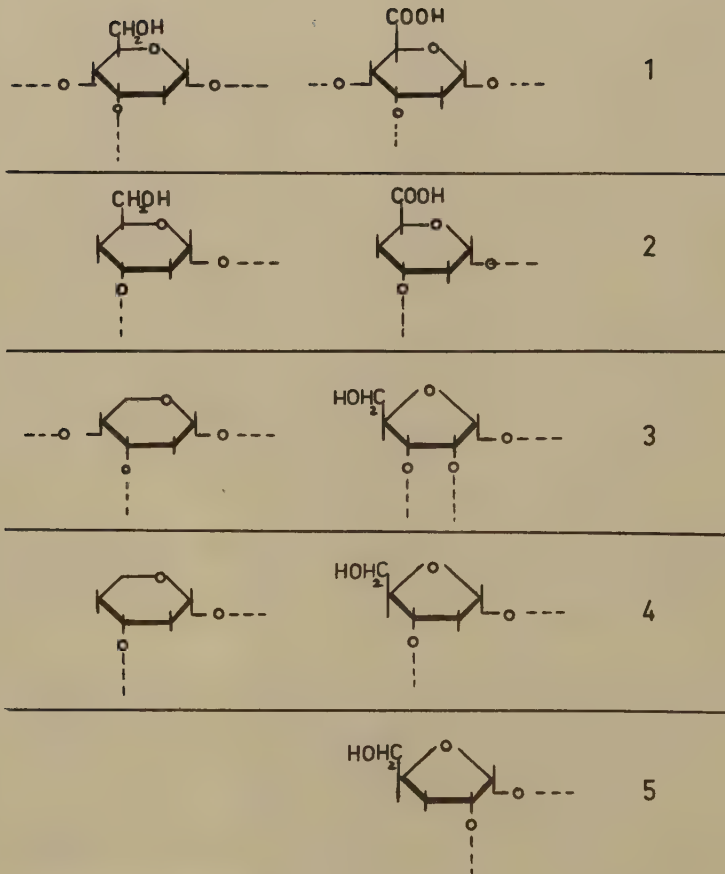


Abb. 12

Möglichkeiten für das Vorliegen eines Teils der Galaktose bzw. Glukuronsäure und der Xylose im Polysaccharidmolekül. (Erklärung siehe Text)

den wurde (46,47,48,49), ist die Möglichkeit der 1,3-glykosidischen Bindung wahrscheinlicher.

2.) Xylose kann als Verzweigungspunkt (Abb.12,3), als 1,3-xylopyranosidisches (Abb.12,4) oder als 1,2-xylofuranosidisches Kettenglied vorliegen (Abb.12,5).

Nach Perjodatoxydation, Hydrolyse und papierchromatographischer Trennung ergab die nach der Perjodatmethode (11) durchgeführte quantitative Bestimmung der nicht oxydierten Anteile folgende Ergebnisse:

30% der vorhandenen Xylose,
20% der vorhandenen Galaktose und
12% der vorhandenen Glukuronsäure

werden von Perjodat nicht gespalten.

Die Gesamtmenge der vorhandenen Rhamnose, Arabinose und Glukose, sowie 70% der vorhandenen Xylose, 80% der vorhandenen Galaktose und 90% der vorhandenen Uronsäure sind somit in der Weise glykosidisch gebunden, daß Perjodatspaltung eintreten kann.

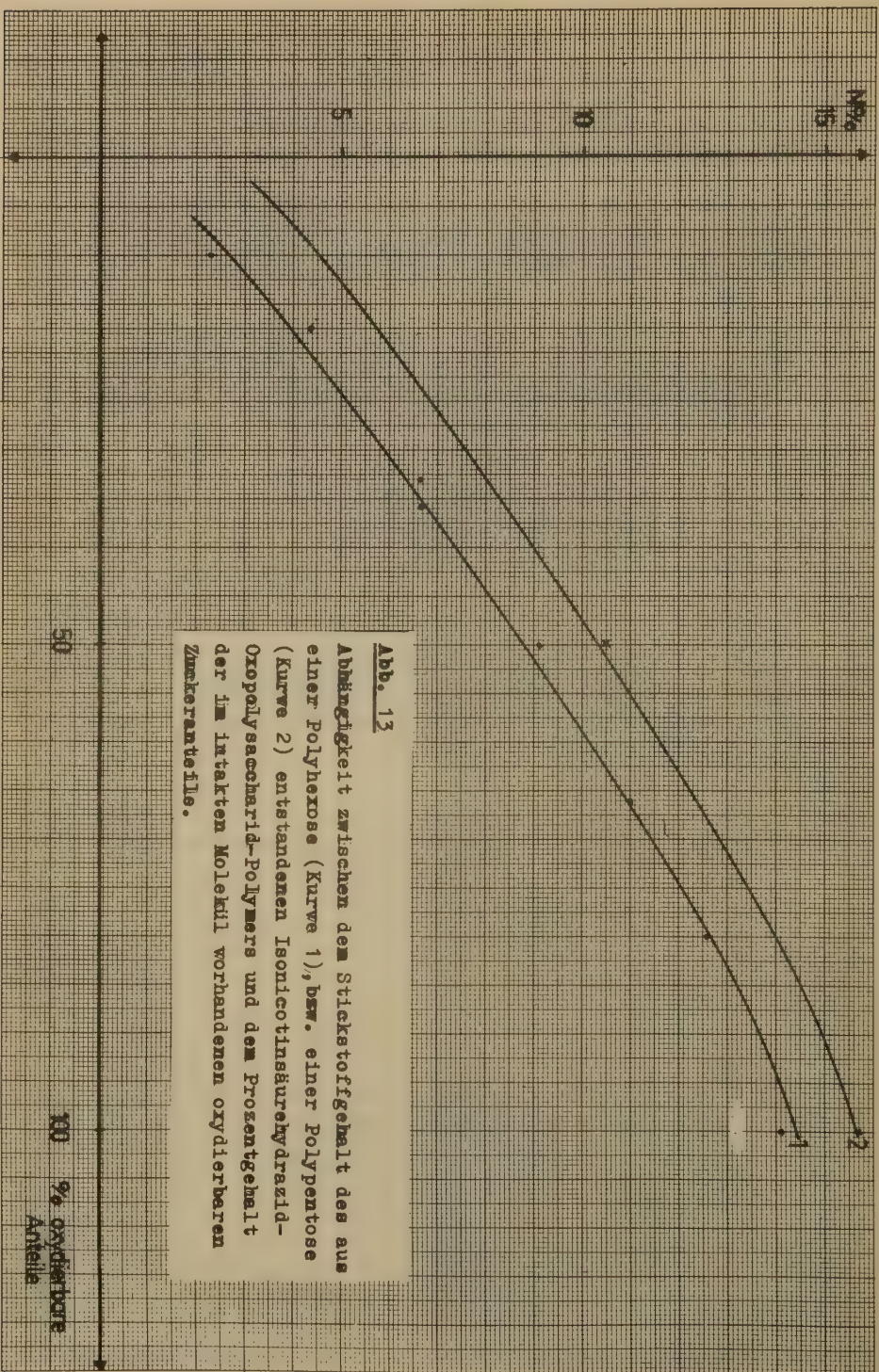


Abb. 13

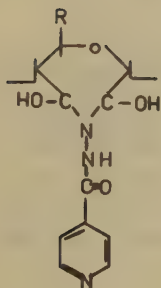
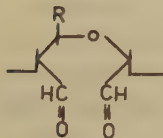
Abhängigkeit zwischen dem Stickstoffgehalt des aus einer Polypentose (Kurve 1), bzw. einer Polypentose (Kurve 2) entstandenen Isonicotinsäurehydrazid-Oxopolysaccharid-Polymeren und dem Prozentgehalt der im intakten Molekül vorhandenen oxydierbaren Zuckeranteile.

3.5.1.5 Der α -Diolgehalt

Eine elegante Methode zur Bestimmung des α -Diolgehalts eines Polysaccharids hat V. C. B A R R Y (50) eingeführt. Säurehydrazide, z.B. Thiosemicarbazid und Isonicotinsäurehydrazid (INH), bilden mit Dialdehyden, die durch Perjodatoxydation von α -Glykolen entstehen, polymere Verbindungen (Abb.14), aus deren Schwefel- bzw. Stickstoffgehalt Rückschlüsse auf den ursprünglichen α -Diolgehalt eines Moleküls möglich sind. Die Kurven in Abb.13 zeigen die Funktion zwischen dem Stickstoffgehalt eines INH-Oxopolysaccharid-Polymers und dem α -Diolgehalt in ursprünglich vorhandenen Poly-

hexosen (Kurve 1 in Abb.13) und Polypentosen (Kurve 2 in Abb.13).

Die Deutung von Ergebnissen, die an Heteropolysacchariden erhalten wurden, ist naturgemäß schwieriger, jedoch läßt sich der α -Diolgehaltsbereich ungefähr ermitteln.



Nach Perjodatoxydation, Reinigung des Oxoschleims und Fällung des INH-Polymers ergab die Stickstoffbestimmung der Fällung einen Gehalt von 11,1% Stickstoff entsprechend 55-65% Zuckeranteile mit α -Diolanordnung im Molekül (s.Abb.13).

60% Zuckeranteile mit α -Diolanordnung bei ca. 25% Verzweigungsgruppen (siehe S.35) läßt auf einen Gehalt von 15% nicht oxydierbarer Kettenglieder schließen. Auch hier wäre an das Vorhandensein von Galaktose in 1,3-glykosidischer Bindung zu denken, was die geringe α -Diolzahl bei nur 25% Verzweigungsgruppen erklären könnte.

Abb. 14

Ausschnitt eines INH-Oxopolysaccharid-Polymers.

3.5.1.6 Molekulargewichtsbestimmung nach Perjodatoxydation

Innerhalb der selektiven Perjodatspaltung aller Polysaccharidtypen kann Formaldehyd nur aus dem C_6 der reduzierenden Endgruppe gebildet werden. Dabei entsteht pro Endglied ein Mol Formaldehyd. Eine Ausnahme bilden die reduzierenden Endglieder von über C_6 gebundenen Polyhexosen, von über C_4 und C_2 gebundenen Polypentopyranosen und von über C_5 und C_2 gebundenen Polypentofuranosen (siehe Abb.5).

Da im Molekül nur eine reduzierende Endgruppe vorhanden sein kann, wird also ein Mol $HCHO$ aus einem Mol Polysaccharid entstehen, sofern die Natur des reduzierenden Endgliedes dies erlaubt.

Die Bestimmung des entstehenden Formaldehyds wurde nach der photometrischen Chromotropsäuremethode (51,52) vorgenommen, die zur Entfernung des $NaJO_4$ -Überschusses nach der Perjodatoxydation variiert wurde (53).

Zur Aufstellung der $HCHO$ -Eichkurve diente mit Perjodat oxydierte Glukose.

Das Molekulargewicht des Schleims ließ sich nach dieser Methode auf ca. 3 000 bis 4 000 errechnen, ein Ergebnis, das mit den von W. K E H R (6) nach physikalischen Methoden und der 3,5 Dinitrosalicylsäuremethode (54) bestimmten Werten gut übereinstimmt.

Die Natur des reduzierenden Endgliedes:

Wegen guter Übereinstimmung der nach verschiedenen Methoden bestimmten Molekulargewichtswerten ist das Ergebnis des $HCHO$ -Verfahrens als richtig anzunehmen. Daraus läßt sich nun nach Abb.5 ableiten, daß die reduzierende Endgruppe nur als über C_4 oder C_3 gebundene Hexose bzw. als über C_3 gebundene Pentofuranose oder -pyranose vorliegen kann.

3.5.1.7 Versuche eines Molekülabbau nach V. C. B A R R Y

Interessante Abbaureaktionen hat B a r r y erstmals an 1,3 Glukanen (Laminaran) durchgeführt (55).

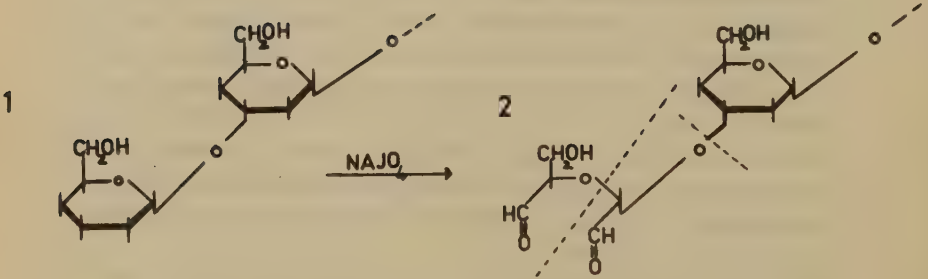
Die Methode besteht in einem Abbau der primär nach der Perjodatoxydation entstandenen Aldehyde. Spaltendes Agens ist Phenylhydrazin, das unter Hydrazonbildung mit dem Dialdehyd reagiert und gleichzeitig eine Spaltung der benachbarten glykosidischen Bindung bewirkt. Daneben tritt auch eine Sprengung des ursprünglichen Hemiacetalrings ein.

B a r r y gelang es, nach dieser Methode Laminaran, in dem wegen der 1,3-glukosidischen Verknüpfung eine Perjodatoxydation nur an den Endgliedern möglich ist, schrittweise abzubauen (Abb.15).

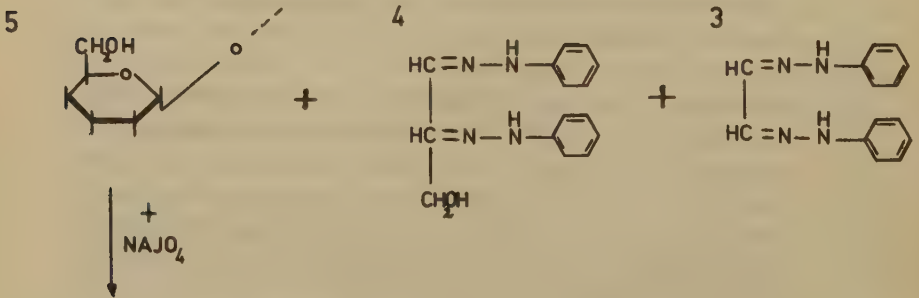
Die Methode wurde später auch auf 1,5- bzw. 1,3-Arabane (56,57), auf Schlangen-Galaktan (58) und Gummi arabicum (59) angewandt, wobei erkannt wurde, daß bestimmte glykosidische Bindungen durch Phenylhydrazin nicht aufgespalten werden. Die glykosidische Verknüpfung zwischen dem nichtoxydierten Molekülanteil und dem C₆ einer oxydierten Hexose zum Beispiel ist nicht spaltbar (56,57).

Der Versuch, durch diese Methode mit Phenylhydrazin und 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu einem Abbau des Kamillenschleims zu gelangen, scheiterte. Es konnten weder Monosaccharid-Osazone - die Verzweigungspunkte des Moleküls müßten das Abbauendprodukt darstellen - noch Hydrazone der möglicherweise entstandenen Aldehyde oder Osazone von α -Oxyaldehyden erhalten werden.

Abb. 15 Schema des B a r r y - Abbaus eines 1,3 Glukans vom nichtreduzierenden Ende aus.



Aus dem nichtreduzierenden Ende des 1,3 Glukans (1) entsteht nach Perjodatspaltung das im nichtreduzierenden Ende gesplattene Oxoprodukt (2).



Aus diesem entsteht mit Phenylhydrazin Glyoxalbisphenylhydrazon (3), Glycerinaldehydphenylosazon (4) und das um eine Einheit verkürzte Polysaccharidmolekül (5), das durch erneute Perjodatoxydation weiter abgebaut werden kann.

3.5.2 Die Acetylierungsmethode zur Hydroxylgehaltsbestimmung

Durch vollständige Acetylierung kann das acetylierte Polysaccharid erhalten werden, in dem alle Hydroxylgruppen verestert sind. Der Acetylgehalt des Acetats ergibt dann ein Maß für die im nicht acetylierten Molekül vorhandenen Hydroxylgruppen.

Aus der quantitativen Bestimmung der Zuckerbausteine errechnet sich ein mittleres Zuckeracetatanhydridgewicht von 247, das 2,2 Acetylreste enthält. Dies entspricht einem theoretischen Acetylgehalt von 38,2% und einem theoretischen Hydroxylgehalt von 25%.

Diese für ein lineares Molekül geltenden Überlegungen müssen auch für ein verzweigtes Polysaccharid Gültigkeit besitzen, da der Hydroxylmehrgehalt der Endgruppen den geringeren Hydroxylgehalt der Verzweigungsgruppen kompensiert.

Nach mehrmaliger Acetylierung nach der Methode von E. L. H I R S T , E. G. V. P E R C I V A L und C. B. W Y L A M (8) ergab sich bei Benutzung von verschiedenen Acetylbestimmungsmethoden (13, 60) ein Acetylgehalt von 36%, was einem OH-Gehalt von 23,5% entspricht.

Durch Reacetylierung gelang es nicht, den Acetylgehalt auf den theoretischen Wert zu erhöhen. Berücksichtigt man jedoch die Fehlerquellen, die in der quantitativen Zuckerbestimmung und damit auch in der theoretischen Berechnung vorhanden sind, so kann doch eine gute Übereinstimmung festgestellt werden.

3.5.3 Die Methylierungsanalyse

Nach vollständiger Methylierung eines Polysaccharids und Spaltung des O-Methylprodukts können aus den Ergebnissen der qualitativen und quantitativen O-Methylzuckerbestimmungen bestimmte Schlüsse, den strukturellen Bau des Moleküls betreffend, gezogen werden.

- a) Tetra-O-methylhexosen, Tri-O-methyl-pentosen, -hexuronsäuren und -rhamosen können nur aus dem nichtreduzierenden und dem reduzierenden Endglied entstehen, sodaß beim Vorliegen von hochmethylierten Zuckern auf bestimmte Zuckerendglieder geschlossen werden kann.
- b) Tri-O-methylhexosen, Di-O-methyl-pentosen, -hexuronsäuren und -rhamosen entstehen aus Kettengliedern. Außerdem können durch Identifizierung der O-Methylzucker die nichtverätherten Hydroxylgruppen und damit die Art der Kettenbildung im Molekül erkannt werden.
- c) Aus den quantitativen Bestimmungen kann das Verhältnis zwischen den aus den Endgliedern und den aus den Kettengliedern entstandenen O-Methylzuckern gebildet werden. Dieser Quotient ist ein Maß für den Endgruppengehalt und damit auch für den Verzweigungsgrad, da bei x Endgliedern die Zahl der Verzweigungsglieder $(V) x-2$ ist (siehe Molekülbilder, S.7).
- d) Da jede Kette im verzweigten Molekül nur höchstens eine Endgruppe besitzt, gibt das Verhältnis zwischen der Zahl der vorhandenen Monosaccharideinheiten und die Zahl der nichtreduzierenden Endglieder die mittlere Kettenlänge ("average Chain length" bzw. "repeating unit") an.

Diese Folgerungen gelten freilich nur, wenn zur Analyse ein vollmethyliertes Material benutzt und die Demethylierung, die bei allen Hydrolyseverfahren beobachtet werden kann, weitgehend eingeschränkt wird.

Diese Methode kann jedoch nur ein Glied in der Strukturauflklärung sein, denn über die Konfiguration der glykosidischen Bindung und über die Anordnung der Zuckerbausteine in Heteropolysacchariden gibt sie keine Auskunft.

Dazu kommt noch, daß die vollständige Methylierung von Pflanzenschleimen sehr schwierig ist (2,3). Die Anwesenheit von größeren Mengen niedrigmethylierter Zucker, z.B. von Di-O-methylhexosen, im O-Methylzuckergemisch ist die Folge, wodurch eine Auswertung der Ergebnisse oft nicht eindeutig ist.

3.5.3.1 Methylierungsmethoden

Von den zur Methylierung benutzten Methoden (61) ist die Dimethylsulfatmethode die gebräuchlichste. Nach Einführung durch T. P U R D I E und J. C. I R V I N E (4), sowie nach Weiterentwicklung von W. N. H A W O R T H (5) wurde dieses Verfahren bei vielen Kohlenhydrat- und insbesondere Polysacchariduntersuchungen eingesetzt.

Die in Wasser oder Lauge gelöste Substanz wird unter starkem Rühren in Anteilen mit äquivalenten Mengen von Dimethylsulfat und Natronlauge (30%) versetzt, wobei darauf zu achten ist, daß zu keinem Zeitpunkt ein die Hydrolyse einleitendes saures Milieu entsteht. Dabei ist eine Temperatur von 40°- 60°C optimal, obwohl andere Autoren eine tiefere fordern (62). Das Arbeiten im Stickstoff-Strom, Änderung der Konzentrationen und Zugabe von Aceton zur besseren Lösung des entstehenden O-Methylprodukts sind Varianten, die ebenfalls mit Erfolg eingesetzt wurden (62).

Die Isolierung des O-Methylpolysaccharids besteht meist nur in der Abtrennung und Reinigung des ausgefallenen Produkts. Es kann aber auch nach Dialyse gegen fließendes Wasser mit Chloroform extrahiert werden.

Nicht nur die Substanz selbst, auch das Acetat läßt sich nach dieser Methode methylieren, wobei vorteilhaft Aceton

als Lösungsmittel benutzt wird (62,63,64,65). Meist führt die Dimethylsulfatmethode zu keinem permethylierten Endprodukt, weshalb andere ergänzende Verfahren - evtl. auch in Kombination (66) - benutzt werden. Methylierung der Thalliumsalze mit Methyljodid (67,68,69), Methylierungen mit Methyljodid und Natrium in flüssigem Ammoniak (70,71) oder mit Diazomethan (72) sind mit Erfolg zur erschöpfenden Methylierung von Polysacchariden verwendet worden.

Sowohl der Schleim als auch das Schleimacetat wurden nach der Dimethylsulfatmethode bis zum konstanten Oxymethylgehalt ($\text{OMe} = 24\%$) mehrmals methyliert. Obwohl dieser niedrige Oxymethylgehalt (Theorie: $\text{OMe} = 34\%$) für eine nicht vollständige Methylierung spricht, ergab jedoch die Untersuchung des nach Methanolyse und Hydrolyse entstandenen O-Methylzuckergemisches die Anwesenheit von nur Spuren unsubstituierter und niedrig methylierter Zucker. Dieses Ergebnis liegt in Übereinstimmung mit anderen Befunden (3), nach denen es erst nach Spaltung des O-Methylprodukts möglich ist, Aussagen über den Methylierungsgrad zu machen.

Eine Oxymethylbestimmung in reiner 2,3,4,6-Tetra-O-methylglukose als Vergleich ergab nur eine 38%ige OCH_3 -Abspaltung (Praxis: $\text{OCH}_3 = 20\%$; Theorie: $\text{OCH}_3 = 52,6\%$) mit der Methode nach F.V I E B Ö C K und A.S C H W A P - P A C H (73), ein Beweis, daß das niedrige Ergebnis nicht durch Verunreinigung des Materials bedingt ist, sondern in dem Bestimmungsverfahren selbst liegt. Aus der Untersuchung des nach mehrmaliger Anwendung der Dimethylsulfatmethode resultierenden O-Methylprodukts kann also auf eine praktisch vollständige Methylierung geschlossen werden.

3.5.3.2 Methanolyse und Hydrolyse des Oxymethylprodukts

Die Spaltung des O-Methylpolysaccharids zu den O-Methylzuckern kann auf zwei Arten durchgeführt werden: Der erste Weg besteht in der direkten Hydrolyse mit $n \text{ H}_2\text{SO}_4$ (69) oder durch Ameisensäure mit nachfolgender O-Formylester-

spaltung (64). Die zweite Methode, die wegen der geringeren Demethylierungsgefahr meist vorgezogen wird, besteht in der Methanolyse mit 1-5%iger methanolischer Salzsäure zu den Methylglykosiden der Oxymethylzucker und in der sich anschließenden Hydrolyse der Methylglykoside mit 0,5 n HCl, wodurch die reduzierenden O-Methylzucker entstehen.

Die Schwierigkeit bei der Spaltung des O-Methylprodukts besteht darin, daß der Hydrolysevorgang wegen der dunklen Farbe des Hydrolysats meist nicht polarometrisch verfolgt werden kann. Eine 5stündige Methanolyse mit 3,5%iger methanolischer Salzsäure und eine 3stündige Hydrolyse mit 0,5 n HCl erwiesen sich jedoch ausreichend für eine quantitative Spaltung.

3.5.3.3 Untersuchung des O-Methylzuckergemischs

3.5.3.3.1 Papierchromatographische Trennung

Durch die Einführung der chromatographischen Methoden konnte die Analyse der O-Methylzucker verfeinert und damit die zur Methylierung notwendige Polysaccharidmenge verringert werden.

Die papierchromatographische Trennung der Oxymethylzucker (74,75,76) ist in vielen Kohlenhydratstrukturaufklärungen benutzt worden. In Vorversuchen erwies sich zur Trennung der neutralen O-Methylzucker das Fließmittelgemisch n-Butanol-Äthanol-Wasser (4:1:5), zur Trennung von O-Methyluronsäuren das Fließmittel n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1) als am geeignetsten.

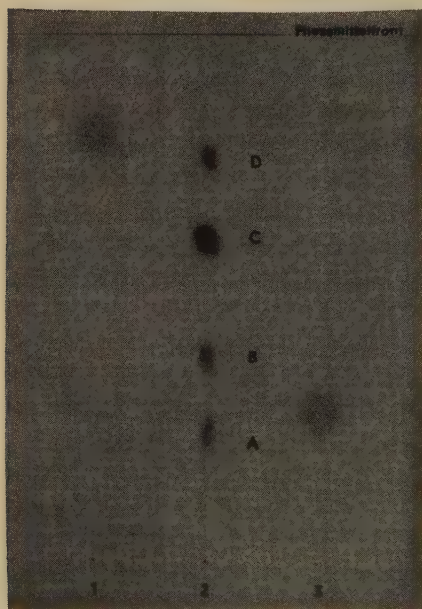
Nach Trennung auf dem Papier und Besprühen mit geeigneten Reagentien (77) können die O-Methylzucker nach ihrem R_{TMG} -Wert und nach den evtl. mit den Reagentien entstehenden Farben unterschieden werden.

Die R_{TMG} -Werte - ein Maß für die Wanderung einer Substanz, bezogen auf 2,3,4,6-Tetra-O-methylglukose - sind wertvolle Hilfsmittel zur Identifizierung eines O-Methylzuckers und wurden für alle vorkommenden neutralen O-Methylzucker (78, 79) und auch für verschiedene O-Methylhexuronsäuren be-

stimmt und zusammengestellt (80).

Das Verhalten der O-Methylzucker gegenüber den verschiedenen Sprühreagentien ist von L.H O U G H, J.K.N.J O N E S und W.H. W A D M A N (77) untersucht worden. Im Rahmen dieser Arbeit interessiert nur die unterschiedliche Reaktion zwischen α -Naphthylamintrichloracetat und O-Methylhexosen bzw. O-Methylpentosen. Letztere ergeben eine mehr oder minder kräftige grüne Farbe, während O-Methylhexosen je nach Methylierungsgrad braune bzw. rote Reaktionsprodukte liefern. Eine Ausnahme bildet, wie eine Untersuchung an Vergleichsmaterial zeigte, Tri-O-methylarabinose, die keine grüne α -Naphthylaminreaktion gibt.

Durch das papierchromatographische Verfahren konnte das Oxymethylzuckergemisch mit dem Fließmittel n-Butanol-Äthanol-Wasser (4:1:5) in 4 Fraktionen aufgetrennt werden:



Fraktion A	R_{TMG}	$< 0,3$
Fraktion B	R_{TMG}	$= 0,45$
Fraktion C	R_{TMG}	$= 0,8$
Fraktion D	R_{TMG}	$= 0,95$

Abb. 16

Papierchromatographische Trennung des O-Methylzuckergemischs (aufsteigend, 16 Std., Fließmittel n-Butanol-Äthanol-Wasser 4:1:5)

- 1 = 2,3,4,6-Tetra-O-methylglukose
- 2 = O-Methylzuckergemisch
- 3 = 3-O-Methylglukose

Die Fraktion A, deren R_{TMG} -Wert in saurem Fließmittel c (siehe S.70) 0,6 - 0,8 beträgt, ist ein Gemisch methylierter Urone Säuren, während die anderen Fraktionen aus neutra-

len O-Methylzuckern bestehen. Bei hoher Dosierung konnten in Durchlaufchromatogrammen Spuren von unsubstituierter Xylose gefunden werden, was vielleicht auf unvollständige, sterisch behinderte Methylierung der Verzweigungspunkte zurückzuführen ist. Bei vollständiger Methylierung müßte im Falle der dreifach gebundenen Verzweigungsglieder aus Xylose quantitativ Mono-O-methylxylose entstehen.

Neben der Abwesenheit von niedrigmethylierten Zuckern ist auch das Mengenverhältnis der Fraktionen B, C und D, wie es sich optisch nach der Anfärbung mit Anilinphthalat ergibt, ein Beweis für die nahezu vollständige Methylierung des Materials. Die Fraktion C ist mengenmäßig vorherrschend, entsprechend den Kettengliedern des Moleküls, und die Fraktion B (Verzweigungsglieder) und C (Endglieder) sind in etwa der gleichen Menge vorhanden, was den theoretischen Verhältnissen entspricht. Das aus dem Acetat hergestellte O-Methylprodukt ist mit dem aus dem Schleim direkt hergestellten O-Methylmaterial identisch, da nach Spaltung die gleichen O-Methylzuckerfraktionen auftraten.

Von den auf dem Papier erhaltenen Fraktionen zeigt die Fraktion C mit α -Naphthylamin eine grüne Farbe, was die Anwesenheit einer O-Methylpentose vermuten läßt.

Wie später gezeigt wird, ist die papierchromatographische Trennung nicht scharf genug: Die erhaltenen Fraktionen sind nicht einheitlich, was bei den geringen R_{TMG} -Differenzen zwischen strukturell verwandten O-Methylzuckern gleichen Methylierungsgrades auch nicht zu erwarten ist.

3.5.3.3.2 Papierelektrophoretische Trennung

Eine weitere Trennungsmöglichkeit für O-Methylzucker besteht in der Anwendung der Papierelektrophorese unter Benutzung von Boratpuffer (81).

Dieses Verfahren läßt wegen der unterschiedlichen Bildungstendenz des Boratkomplexes und der damit unterschiedlichen Wanderung zweier O-Methylzucker mit gleichem Methylierungsgrad Rückschlüsse auf den Bau des O-Methylzuckers zu (z.B. 2,4-Di-O-methylglukose $M_G < 0,05$; 2,3-Di-O-methylglukose $M_G = 0,31$).

Die höher methylierten Zucker lassen sich nach diesem Verfahren nicht trennen, so daß seine Anwendung auf die Trennung der O-Methyluronsäuren und der niedrigmethylierten Zucker beschränkt bleibt.

Die M_G -Werte, ein Maß für die Wanderung einer Substanz bezogen auf Glukose, müssen wegen elektroosmotischer Erscheinungen, die eine scheinbare kathodische Wanderung der nicht zur Boratkomplexbildung befähigten O-Methylzucker bewirken, mit Tetra-O-methylglukose als Vergleich korrigiert werden.

Das nach vollständiger Methylierung und Spaltung erhaltene O-Methylzuckergemisch konnte durch Papierelektrophorese in 4 Fraktionen aufgetrennt werden:

Fraktion 1	M_G	=	0,0
Fraktion 2	M_G	=	0,2
Fraktion 3	M_G	=	0,51
Fraktion 4	M_G	=	0,64

Die Fraktionen 3 und 4 bestehen aus O-Methyluronsäure und bilden mit Anilinphthalat die gleiche Farbe wie die Papierfraktion A.

3.5.3.3.3 Säulenchromatographische Trennung

Die säulenchromatographischen Trennungsmethoden haben bei der Untersuchung von Zucker- und O-Methylzuckergemischen schon große Dienste geleistet (75, 84). Insbesondere die O-Methylzuckertrennungen können an der Säule schärfer und exakter durchgeführt werden, und es gelingt oft, Zucker zu isolieren, die auf papierchromatographischem oder papierelektrophoretischem Wege nicht erkannt wurden.

Die ersten Trennungsversuche wurden an Kieselsäure-Wasser-Säulen durchgeführt (91). Auch die Verteilungschromatographie an Kohle-Celite-Säulen erwies sich für die Trennung von O-Methylzuckern verschiedenen Methylierungsgrads geeignet (92, 93, 108). Später wurde jedoch in Polysaccharid-Strukturarbeiten Cellulose (85, 86, 87, 88) oder Hydrocellulose (89, 90, 12) - eine teilweise mit Säure degradierte Cellulose - vorgezogen, wobei Cellulose-Wasser als stationäre und in den meisten Fällen ein wassergesättigtes Benzin (100° - 120°C) -n-Butanol-Gemisch als mobile Phase dienten.

Daneben kamen auch andere Fließmittel wie Methyläthylketon-Wasser-Azeotrop (89), Butan-2-on (86) und Benzol-Äthanol-Gemisch (12) zum Einsatz.

Der Wasseranteil der mobilen Phase soll während der Trennung - am besten kontinuierlich - ansteigen, um auch eine gute Trennung der gut wasserlöslichen niedrigmethylierten und nichtsubstituierten Zucker zu erzielen.

Im Rahmen dieser Arbeit erwiesen sich Cellulose-Wasser als stationäre und das wassergesättigte Benzin (100° - 120°C)-n-Butanol-Gemisch (7:3 v/v) als mobile Phase am geeignetsten, wobei der Einsatz eines automatischen Fraktionssammlers⁺⁾ die Trennung erleichterte.

Eine so durchgeführte Trennung des gesamten O-Methylzuckergemischs ergab keine reinen Fraktionen, da die Trennung der neutralen O-Methylzucker mit der Trennung

⁺⁾ Fractomat Y2, Fa. Hako, Jungingen.

der O-Methylglukuronsäuren parallel lief.

Es mußte deshalb vor einer neuen Trennung in einen neutralen und einen sauren O-Methylzuckeranteil getrennt werden. Zur Auftrennung kann die unterschiedliche Löslichkeit der neutralen O-Methylzucker und der Salze der O-Methyluronsäuren in Chloroform benutzt werden, wobei die neutralen O-Methylzucker quantitativ durch Chloroform extrahiert werden (66).

Durch säulenchromatographische Trennung der beiden Fraktionen (Fraktion A = neutrales O-Methylzuckergemisch; Fraktion B = Methyluronsäuregemisch) konnte folgende Auftrennung erhalten werden:

Die Fraktion A wurde in 8 Fraktionen getrennt, die mit Ausnahme von Fraktion 2 und 5 einheitlich sind:

Fraktion	Menge i.mg	R _{TMG} ^{+))}
1	32	0,95
2	10	0,95/0,92
3	17	0,92
4	126	0,8
5	16	0,8/0,75
6	78	0,75
7	12	0,5
8	16	0,2

Aus Fraktion B resultierten:

Fraktion	Menge i.mg	R _{TMG} ^{++))}
a	180	0,85
b	131	0,75
c	320	-

+) gemessen in Fließmittel n-Butanol-Äthanol-Wasser (4:1:5)

++) gemessen in Fließmittel n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1)

Durch papierchromatographische Untersuchungen in den Fließmitteln n-Butanol-Äthanol-Wasser (4:1:5) und n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1) unter Benutzung der selbst hergestellten Vergleichs-O-Methylzucker zeigte sich die Überlegenheit der säulenchromatographischen Methode. Während die papierchromatographische Trennung nur 4 Fraktionen lieferte, resultierten nach der Säulentrennung 11 Fraktionen.

Die Papierfraktionen A, B, C, und D sind nicht einheitlich und bestehen aus mehreren O-Methylzuckern bzw. O-Methylglukuronsäuren.

Folgende O-Methylzuckerfraktionen erwiesen sich papierchromatographisch mit Vergleichs-O-Methylzuckern identisch:

Fraktion 1	Tri-O-methylarabinose
3	Tetra-O-methylgalaktose
4	Tri-O-methylgalaktose
8	Xylose
a	Tri-O-methylglukuronsäure

Die in den Fraktionen a und b enthaltenen O-Methylglukuronsäuren müssen an C₂ methyliert sein, da die mit Anilinphthalat entstehende rote Farbe die Abwesenheit eines freien Hydroxyls an C₂ beweist (80).

Eine andere Methode, die die Zuordnung der Fraktionen zu einem O-Methylzucker erlaubt, ist die Demethylierungsmethode, wobei nach teilweiser oder totaler Demethylierung mit wässrigem Bromwasserstoff ein Gemisch aus unsubstituierten Zuckern und partiell demethylierten O-Methylzuckern entsteht (77).

K. H E S S und F. N E U M A N N verwendeten ursprünglich Bromwasserstoff und Eisessig als Entalkylierungsmittel (94), das jedoch durch teilweise Zerstörung der Zucker den Nachweis gefährdet, weshalb schonender mit wässrigem Bromwasserstoff gearbeitet wird.

Eine neuere Desalkylierungsmethode, bei der Bortrichlorid bzw. Bortribromid als Demethylierungsmittel eingesetzt wurden (101), könnte vielleicht eine noch bessere Ausbeute an demethylierten Zuckern liefern.

Durch papierchromatographische Untersuchungen der mit wässrigem Bromwasserstoff demethylierten Fraktionen konnten folgende unsubstituierte Zucker den verschiedenen O-Methylzuckerfraktionen zugeordnet werden:

Fraktion	Identifizierte Zucker
1	Arabinose
2	Galaktose/Arabinose
3	Galaktose
4	Galaktose
5	Galaktose/Arabinose
6	Arabinose

Die Fraktion C besteht aus teilweise methylierter, schwer hydrolysierbarer Aldobiuronsäure, da nach erneuter verstärkter Hydrolyse Xylose und Di-O-methylglukuronsäure nachgewiesen werden konnten.

Ein ähnliches Spaltprodukt, eine Tetra-O-methylaldobiuronsäure (3-O-Methyl-2-O- 2,3,4-Tri-O-methylglukuronosyl -D-xylose) wurde nach Methylierung von aus Gerstenschalen isolierter Hemicellulose gefunden (87). Auch bei der Spaltung von methylierter Arabinsäure (Gummi arabicum) trat eine methylierte Aldobiuronsäure (Hexa-O-methyl-6-8-D-glukuronopyranosyl-D-galaktose) auf, die nach weiterer Hydrolyse 2,3,4-Tri-O-methyl-D-glukuronsäure und 2,3,4-Tri-O-methyl-D-galaktose lieferte (114).

Die quantitative Bestimmung der einzelnen Fraktionen konnte nur durch Wägung durchgeführt werden. Die mit Anilinphthalat (96), Benzidin (97), 3,5-Dinitrosalicylsäure (98) und Phenolschwefelsäure (99) arbeitenden photometrischen Verfahren verlangen Vergleichskurven der einzelnen O-Methylzucker, die aber in dieser Reinheit nicht zur Verfügung standen.

Auch die volumetrische Natriumhypoiodit-Methode (78, 95) schied aus, weil wenigstens 0,5 - 3 mg Substanz zur Bestimmung erforderlich sind, eine Menge, die auf dem Papier nicht erhalten werden kann.

Die Eigenschaften und Daten der einzelnen O-Methylzucker-säulenfraktionen und ihre Zuordnung zu bestimmten O-Methylzuckern sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tab. 1

Übersicht über die isolierten O-Methylzucker und ihre Eigenschaften

Nr.	mg	R _{TMG} ⁺⁾	R _{TMG} ⁺⁺⁾	M _G	Demethy- lierung	identisch mit	Mol. Verh.
1	32	0,95		0,0	Arabinose	Tri-O-methyl- arabinose	2
2	10	0,95/0,92		0,0	Arabinose Galaktose	Tri-O-methyl- arabinose Tetra-O-methyl- galaktose	
3	17	0,92		0,0	Galaktose	Tetra-O-methyl- galaktose	1
4	126	0,8		0,0	Galaktose	Tri-O-methyl- galaktose	6
5	16	0,8/0,75		0,0	Galaktose Arabinose	Tri-O-methyl- galaktose Di-O-methyl- arabinose	
6	78	0,75		0,0	Arabinose	Di-O-methyl- arabinose	5
7	12	0,5		0,15	-	-	-
8	16	0,3				Xylose	1
a	180	0,2	0,85	0,65	-	Tri-O-methyl- glukuronsäure	8
b	131	0,18	0,75	0,51	-	Di-O-methyl- glukuronsäure	6
c	320	nach Hydrolyse 0,3/0,18	0,3/0,75	-	-	Xylose Di-O-methyl- glukuronsäure	-

+) gemessen in Fließmittel n-Butanol-Äthanol-Wasser (4:1:5)

++) gemessen in Fließmittel n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1)

3.6 Diskussion

Aus dem mittleren Anhydridgewicht der Zuckerbausteine von 158, das sich aus der quantitativen Bausteinanalyse ergibt, und dem Molekulargewichtswert von ca. 4 100 läßt sich ein Polymerisationsgrad von 26 errechnen (d.h. 26 Zuckerbausteine 6 verschiedener Zucker bilden das Polysaccharidmolekül).

Aus der quantitativen Bestimmung folgt weiterhin, daß die 26 Bausteine aus 11 Glukuronsäure-, 6 Xylose-, 3 Arabinose- und 4 Galaktoseeinheiten sowie aus je einem Glukose- und Rhamnosebaustein bestehen.

Das Molekül ist verzweigt und besitzt einen Endgruppengehalt von ca. 25%, was einem Verzweigungsgruppengehalt von ca. 23% entspricht.

Von den 26 Gliedern müssen also 6 als Verzweigungs-, 7 als nichtreduzierende End-, 12 als Kettenglieder sowie eines als reduzierendes Endglied vorliegen.

Durch die vorliegenden Ergebnisse können die einzelnen Zuckereinheiten einer bestimmten Lage in dem verzweigten Molekül zugeordnet werden:

1.) Xylose:

Die 6 Xylose-Einheiten bilden die Verzweigungsstellen des Moleküls.

Obwohl eine Mono-O-methylxylose oder andere O-Methylxylosen nicht gefunden werden konnten, muß Xylose die Verzweigungspunkte des Moleküls bilden. Das ergibt sich aus den Ergebnissen der Perjodat oxydation, nach denen die Xylose von Perjodat nicht gespalten wird, was nur beim Vorliegen dieser Pentose als Verzweigungspunkt oder als 1,3-pyranosidisch und 1,3- bzw. 1,2-furanosidisch gebundenes Kettenglied zutrifft. Außerdem entspricht der Xylosegehalt des Schleimes (21%) etwa dem vom Endgruppengehalt (23-27%) sich ableitenden Verzweigungsgruppengehalt (19,7-23%). Eine sterisch be-

hinderte Methylierung der freien Hydroxylgruppe des Verzweigungspunkts Xylose könnte die Abwesenheit von Mono-O-methylxylose im O-Methylzuckergemisch erklären. Eine Erkennung der Verknüpfungsstellen der Xylose mit den drei benachbarten Zuckerbausteinen ist nicht möglich.

Mindestens einer dieser benachbarten Zuckeranteile besteht aber aus Glukuronsäure, was aus dem Vorliegen einer aus Xylose und Glukuronsäure bestehenden Aldobiruronsäure folgt.

2.) Arabinose:

Von den 3 Arabinose-Einheiten liegen im Molekül eines als Endglied und zwei als Kettenglieder vor.

Die isolierten O-Methylarabinosen (Tri-O-methylarabinose und Di-O-methylarabinose) zeigen, daß Arabinose sowohl als Endglied als auch als Kettenglied eingebaut ist. Aus dem molekularen Verhältnis der beiden O-Methylarabinosen (1:2) folgt, daß ein Endglied und zwei Kettenglieder vorhanden sind.

3.) Galaktose:

Die 4 am Molekülbau beteiligten Galaktose-Einheiten besetzen eine Endgruppe und 3 Kettenglieder.

Die Tetra-O-methylgalaktose zeigt die Stellung der Galaktose als Endgruppe an, während die Tri-O-methylgalaktose die Anwesenheit der Galaktose als Kettenglied beweist. Das molekulare Verhältnis der beiden O-Methylzucker (1:6) macht das Vorliegen von einer Galaktoseend- und von 3 Galaktosekettengliedern wahrscheinlich. Zumindest die Kettenglieder sind 1,3-glykosidisch gebunden, da sie einer Perjodatspaltung nicht zugänglich sind, und die Verzweigungspunkte der Xylose vorbehalten sind (siehe Abs.1; Xylose).

4.) Glukose:

Die am Bau beteiligte einzelne Glukose-Einheit ist Kettenglied.

Die Glukose wird von Perjodat quantitativ oxydiert, und nach Methylierung und Spaltung konnte keine Tetra-O-methylglukose gefunden werden.

Ein 1,4- oder 1,6-gebundenes Kettenglied läßt sich mit den Ergebnissen vereinbaren, doch ist kein Beweis dafür vorhanden.

5.) Rhamnose:

Die eine vorhandene Rhamnose-Einheit ist Kettenglied.

Es liegen dieselben Ergebnisse wie im Falle der Glukose vor. Ihre Eingliederung als Kettenglied ist möglich. Nähere Aussagen nach den Ergebnissen können nicht gemacht werden.

6.) Glukuronsäure:

4 Endglieder und 7 Kettenglieder werden von den 11 am Bau beteiligten Glukuronsäure-Einheiten gestellt.

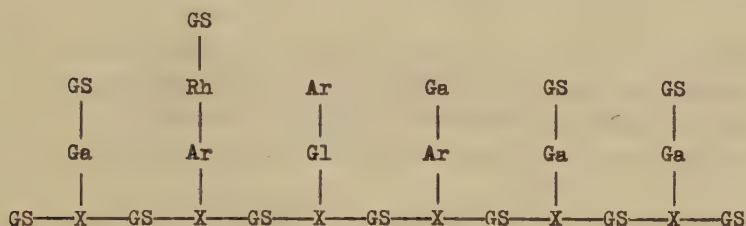
Die Endglieder werden bewiesen durch Tri-O-methylglukuronsäure, während Di-O-methylglukuronsäure die Anwesenheit von Glukuronsäure-Kettengliedern nachweist. Das molekulare Verhältnis der beiden isolierten O-Methylglukuronsäuren (ca. 1:1) fordert ein Endglieder/Kettenglieder-Verhältnis von ca. 1:1.

Die Spuren intakter Glukuronsäure im perjodat-oxydierten Material machen zumindest für einen Teil der vorliegenden Glukuronsäure eine 1,3-glykosidische Bindung wahrscheinlich.

Xylose ist ein Nachbarzucker der Glukuronsäure, da eine aus beiden Zuckern bestehende Aldobiuronsäure erkannt werden konnte.

Diese Angaben lassen sich zu Molekülbildern vereinigen, von denen eines nachfolgend dargestellt ist.⁺⁾

In diesem seitenverzweigten Molekül besteht die Hauptkette aus alternierenden Xylose- und Glukuronsäure-Einheiten, und die an die Xylose-Einheiten geknüpften Seitenketten werden aus Galaktose-, Arabinose-, Rhamnose- oder Glukose-Kettengliedern und Arabinose-, Galaktose- und Glukuronsäure-Endgliedern gebildet.



Dieses Molekülbild ist nur eine Möglichkeit unter vielen, die Versuchsergebnisse in einem Formelbild darzustellen. Innerhalb dieses zur Diskussion gestellten Moleküls sind folgende Variationen möglich:

- 1.) Die Endglieder können nicht einer bestimmten Endstelle zugeordnet werden und sind untereinander austauschbar.
- 2.) Auch die Kettenglieder sind durch ihre Nachbarzucker nicht fixiert und können untereinander vertauscht werden.
- 3.) Die Kettenglieder der Seitenketten sitzen möglicherweise in der Hauptkette, so daß die Seitenverzweigungen nur aus nichtreduzierenden Endgruppen bestehen.
- 4.) Andere Verzweigungstypen - einfache bzw. multiple Verzweigungen - sind möglich.

Aus diesen Kombinationsmöglichkeiten läßt sich die Viel-

^{+) Es bedeuten:}

GS = Glukuronsäure	Ar = Arabinose
Ga = Galaktose	X = Xylose
Gl = Glukose	Rh = Rhamnose

zahl der nach diesen Ergebnissen noch möglichen Struktur-
bilder erkennen. Jede dieser Formen wäre möglich, ohne
daß das Molekülbild als sicher angesehen werden könnte.

Zur eindeutigen Klärung der Struktur des Kamillenschleimes
fehlen noch einige Angaben. Insbesondere die Art der gly-
kosidischen Bindungen, die Reihenfolge der Zuckerbausteine
und die Art der Verzweigung sind noch nicht in allen Ein-
zelheiten geklärt.

Endgültigen Aufschluß über diese Fragen kann vielleicht
die partielle, enzymatische Hydrolyse und die Identifi-
zierung der dabei entstehenden Di- und Oligosaccharide
geben, was weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben
muß.

	Seite
4 <u>Experimenteller Teil</u>	70
4.1 Gewinnung, Reinigung und Verhalten gegenüber Alkali	71
4.2 Qualitative und quantitative Bestimmung der Zuckerbestandteile	73
4.2.1 Qualitative Bestimmung	73
4.2.2 Quantitative Bestimmung	74
4.3 Einige chemische Eigenschaften	76
4.4 Einige physikalische Eigenschaften	78
4.4.1 IR-Absorptionsmessung	78
4.4.2 DK-Messung	78
4.5 Perjodatoxydation	80
4.5.1 Ameisensäurebestimmung	80
4.5.2 Bestimmung des Perjodatverbrauchs	80
4.5.3 Qualitative und quantitative Bestimmung der Oxoschleim-Hydrolyse-Produkte	83
4.5.4 Herstellung und Analyse des INH-Oxoschleim- polymers	85
4.5.5 Molekulargewichtsbestimmung durch Perjodatspaltung	85
4.6 Acetylierung	87
4.7 Methylierung des Schleimes und des Acetylprodukts	88
4.8 Methanolyse und Hydrolyse der O-Methylprodukte	88
4.9 Trennung und Isolierung der O-Methylzucker	89
4.9.1 Papierchromatographische Trennung	89
4.9.2 Papierelektrophoretische Trennung	91
4.9.3 Herstellung und chromatographisches Verhalten der Vergleichs-O-Methylzucker	91
4.9.4 Säulenchromatographische Trennung	93
4.9.4.1 Trennung des nichtvorgetrennten O-Methylzuckergemisches	93
4.9.4.2 Trennung des vorgetrennten O-Methylzuckergemisches	94
4.9.5 Untersuchung der Säulenfraktionen	95

4 Experimenteller Teil

Allgemeine Vorbemerkungen:

- 1.) Das Eindampfen geschieht immer im Vakuum, wobei die Temperatur von 40°C nicht überschritten wird.
- 2.) Die benutzten Fließmittel werden, um Wiederholungen zu vermeiden, mit Buchstaben gekennzeichnet:

Fließmittel a : n-Butanol-Pyridin-Wasser 10:3:3 v/v/v

Fließmittel b : n-Butanol-Äthanol-Wasser 4:1:5 v/v/v

Fließmittel c : n-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1 v/v/v

Fließmittel d : Pyridin-Essigester-Eis-
essig-Wasser 5:5:1:3 v/v/v/v

- 3.) Die angegebenen R_{TMG} -Werte (in der angelsächsischen Literatur irreführend als R_G -Werte bezeichnet) sind bezogen auf 2,3,4,6-Tetra-O-methylglukose ($R_{TMG} = 1,0$ gesetzt). Die zu den R_{TMG} -Werten gehörenden Fließmittel sind jeweils angegeben.
- 4.) Für absteigende und aufsteigende papierchromatographische Trennungen wurde Schleicher u. Schüll-Papier 2043 b mgl benutzt.
- 5.) Die elektrophoretischen Trennungen wurden im Elphor-H-Gerät unter Benutzung von Schleicher u. Schüll 2043 a mgl - Papierstreifen (31,4x3,4 cm), in Boratpuffer (pH 11), bei einer Klemmspannung von 110 V und bei 8stündiger Entwicklungszeit durchgeführt.
Die M_G -Werte sind bezogen auf Glukose und wurden entsprechend dem elektroosmotischen Effekt, der durch Vergleichswanderung von 2,3,4,6-Tetra-O-methylglukose gemessen wurde, korrigiert (81).
- 6.) Als Sprühmittel zum Nachweis sowohl der freien als auch der methylierten Zucker auf Chromatogrammen und Pherogrammen diente, sofern nichts anderes angegeben wurde, Anilinphthalatlösung⁺ (82, 77).

⁺) Die Zusammensetzung dieses Sprühmittels und die der anderen in dieser Arbeit erwähnten Sprühreagentien findet sich in dem Buch "Chromatographie", E.MERCK, Darmstadt (1959).

4.1 Gewinnung, Reinigung und Verhalten des Polysaccharids gegenüber Alkali

Gewinnung und Reinigung:

Die Droge (Blütenköpfchen von *Matricaria chamomilla*) wurde in Tontöpfen mit 60%igem Äthanol mazeriert und abgepreßt. Das Preßgut^{+) (50 kg) wurde mit warmem Wasser (40° C) erschöpfend extrahiert und der Extrakt im Vakuum eingedampft. Es resultierten 4 kg eines Spissum-Extraktes, der noch beträchtliche Mengen an ätherischem Oel enthielt.}

Nach mehrmaligem Umfällen des Materials aus wässriger Lösung mit je 8 l Äthanol (96%), wobei sich ein Farbwechsel von schwarz nach hellbraun vollzog, konnten 600 g Rohschleim erhalten werden (Asche = 37%, Stickstoff = 1,16%, OCH_3 = 2,4%, pH 3,3). Die trübe Lösung des Materials in 12 l Wasser (pH 5,8-6) wurde durch 150 g Celite 435⁺⁺⁾ geklärt und über Kationen- und anschließend über Anionenaustauscher geschickt (Kationenaustauscher: M E R C K I, 1,5 l, 70 x 4 cm - Säule, Abflußgeschwindigkeit 8 ml/Min., Eluat-pH 2-3; Anionenaustauscher: M E R C K II, 2 l, 85 x 4 cm - Säule, Abflußgeschwindigkeit 10 ml/Min., Eluat-pH 3).

15 Liter wässrige Lösung (Trockengehalt = 0,8%) ergaben nach Sprühtrocknung in einem Krause-Zerstäubungstrockner⁺⁺⁺⁾ (Drehzahl 15 000 U/Min., Temperatur an der Zerstäuberdüse 75° C) 80 g eines bräunlichen voluminösen Pulvers.

Verhalten gegenüber Alkali:

1,0 g Substanz wurden 15 Min. lang bei 100° C und 15 Std. bei Zimmertemperatur mit 20 ml 2n NaOH behandelt (8). Nach

⁺⁾ Dem Direktor der Firma C H E M I E W E R K H O M - B U R G, Zweigniederlassung der Degussa, Frankfurt/M., Herrn Dr. E. K O H L S T A E D T, sei auch an dieser Stelle besonders gedankt für die freundliche Überlassung von Kamillenextraktionsrückständen.

⁺⁺⁾ Der Firma S E R V A, Heidelberg.

⁺⁺⁺⁾ Der Firma L U R G I, Frankfurt/M., danken wir vielmals für ihre Unterstützung.

Neutralisation mit Essigsäure, Dialyse in fließendem Wasser (8 Tage), Eindampfen und Fällung mit Methanol resultierten 0,5 g.

Im Filtrat der Methanolfällung konnte nach Eindampfen und papierchromatographischer Untersuchung (Fließmittel c) Glukuronsäure identifiziert werden.

Die Fällung (0,1 g) ergab nach Hydrolyse (3 Std., 100° C) mit n Schwefelsäure (10 ml), Neutralisation mit Bariumcarbonat, Eindampfen und papierchromatographischer Trennung (absteigend, Fließmittel a) die Anwesenheit von Xylose, Arabinose, Glukose, Galaktose, Rhamnose und einer Uronsäure.

Nach Behandlung von 1,0 g Pulver in wässriger Lösung mit 2n Ba(OH)₂ wurde ein Niederschlag erhalten; dieser wurde abgesaugt und gewaschen (0,75 g). Das mit Ionenaustauschern entionisierte Filtrat war frei von mit Alkohol fällbaren Stoffen und frei von Monosacchariden.

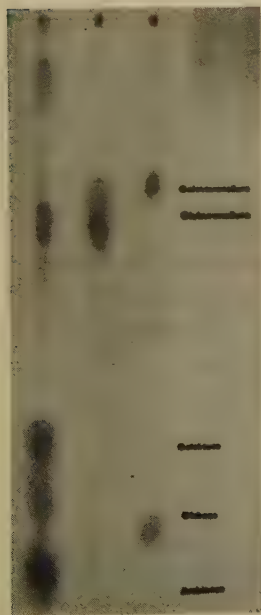
Die Hydrolyse von 0,2 g des Niederschlags in 2n Schwefelsäure (10 ml, 3 Std., 100° C) ergab nach Neutralisation mit BaCO₃, Absaugen und Eindampfen sowie nach papierchromatographischer Untersuchung (absteigend, Fließmittel a, b und c) die Anwesenheit aller ursprünglich vorhandenen Zuckerbestandteile.

4.2 Qualitative und quantitative Bestimmung der Zuckerbestandteile

4.2.1 Qualitative Bestimmung:

200 mg des Polysaccharids wurden mit 2n H_2SO_4 (10 ml, 3 Std., $100^\circ C$) hydrolysiert. Nach der Neutralisation mit Bariumcarbonat und Eindampfen konnten papierchromatographisch (absteigend, Fließmittel a, b, c und d, 48-100 Std.) folgende Zucker identifiziert werden: Xylose, Arabinose, Glukose, Galaktose, Rhamnose und Uronsäure.

500 mg Polysaccharid wurden mit 20 ml n Schwefelsäure (3 Std., $100^\circ C$) hydrolysiert. Nach der Neutralisation in einer Austauschersäule (M e r c k II, 30 x 2 cm) wurde eingedampft und papierchromatographisch (absteigend, Fließmittel d, 48 Std.) mit Glukuronsäure und Galakturonsäure als Vergleich getrennt (107). Es ergab sich die Anwesenheit von Glukuronsäure ($R_{Glukose} = 0,4$); der $R_{Glukose}$ -Wert der Galakturonsäure betrug 0,32.



Außer Anilinphthalat wurden auch andere Sprühmittel benutzt (75), z.B.: 3,5-Dinitrosalicylsäure, 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid und p-Anisidin, die zum gleichen Ergebnis führten, jedoch keine Vorteile gegenüber dem von nun an allein benutzten Anilinphthalat besitzen.

Abb. 17

Papierchromatographischer Nachweis der vorliegenden Hexuronsäure.

Fließmittel Pyridin-Äthylacetat-Eisessig-Wasser (5:5:1:3), absteigend, 48 Std.

1 = Schleimhydrolysat

2 = Glukuronsäure

3 = Galakturonsäure und Glukose.

(Der Glukuronsäurefleck in 1 wurde zur besseren Erkennung verstärkt.)

4.2.2 Quantitative Bestimmung

Es wurden 200 mg mit 2n H_2SO_4 (10 ml, 2 Std., $100^\circ C$) hydrolysiert. Nach Neutralisation und Eindampfen wurde papierchromatographisch unter Benutzung von Leitchromatogrammen (absteigend, Fließmittel a, 72 Std.) getrennt, die Zuckerflecken ausgeschnitten und mit je 5 ml Wasser in Mikrosoxhlet eluiert. 5 ml Eluat wurden mit 1 ml 0,25 n $NaJO_4$ -Lösung 20 Min. lang bei $100^\circ C$ oxydiert, nach Abkühlung mit 0,3 ml Äthylenglykol versetzt und mit 0,01 n NaOH gegen Methylrot titriert (11). Gleichlaufend erfolgte eine Blindwertbestimmung ohne Polysaccharid-Zusatz. (1 ml 0,01 n NaOH entsprechen 0,46 mg $HCOOH$ oder 0,375 mg Pentose oder 0,36 mg Hexose oder 0,388 mg Hexuronsäure oder 0,41 mg Rhamnose)

Tab. 2

Ergebnisse der quantitativen Zuckerbestimmung.⁺)

Xyl.	Ara.	Glu.	Gal.	Rha.	Urons.	
0,53	0,31	0,15	0,28	0,08	0,85	ml 0,01 n NaOH
0,199	0,116	0,054	0,1	0,03	0,33	mg Zucker im Eluat
7	3	2	3	1	10	molek. Verhältnis

In einer weiteren quantitativen Bestimmung wurden unter den gleichen Bedingungen wie oben 177 mg des Schleimstoffes hydrolysiert. Nach Zugabe von 32 mg Ribose (12), Neutralisation, Eindampfen, papierchromatographischer Trennung (absteigend, Fließmittel c, 72 Std.), Ausschneiden, Elution und Perjodatoxydation wie oben ergaben sich folgende Werte (Blindwert = 0,3 ml 0,01 n NaOH):

⁺) Für die einzelnen Zucker wurden folgende Abkürzungen benutzt: Xyl.= Xylose, Ara.= Arabinose, Glu.= Glukose, Gal.= Galaktose, Rha.= Rhamnose, Urons.= Glukuronsäure.

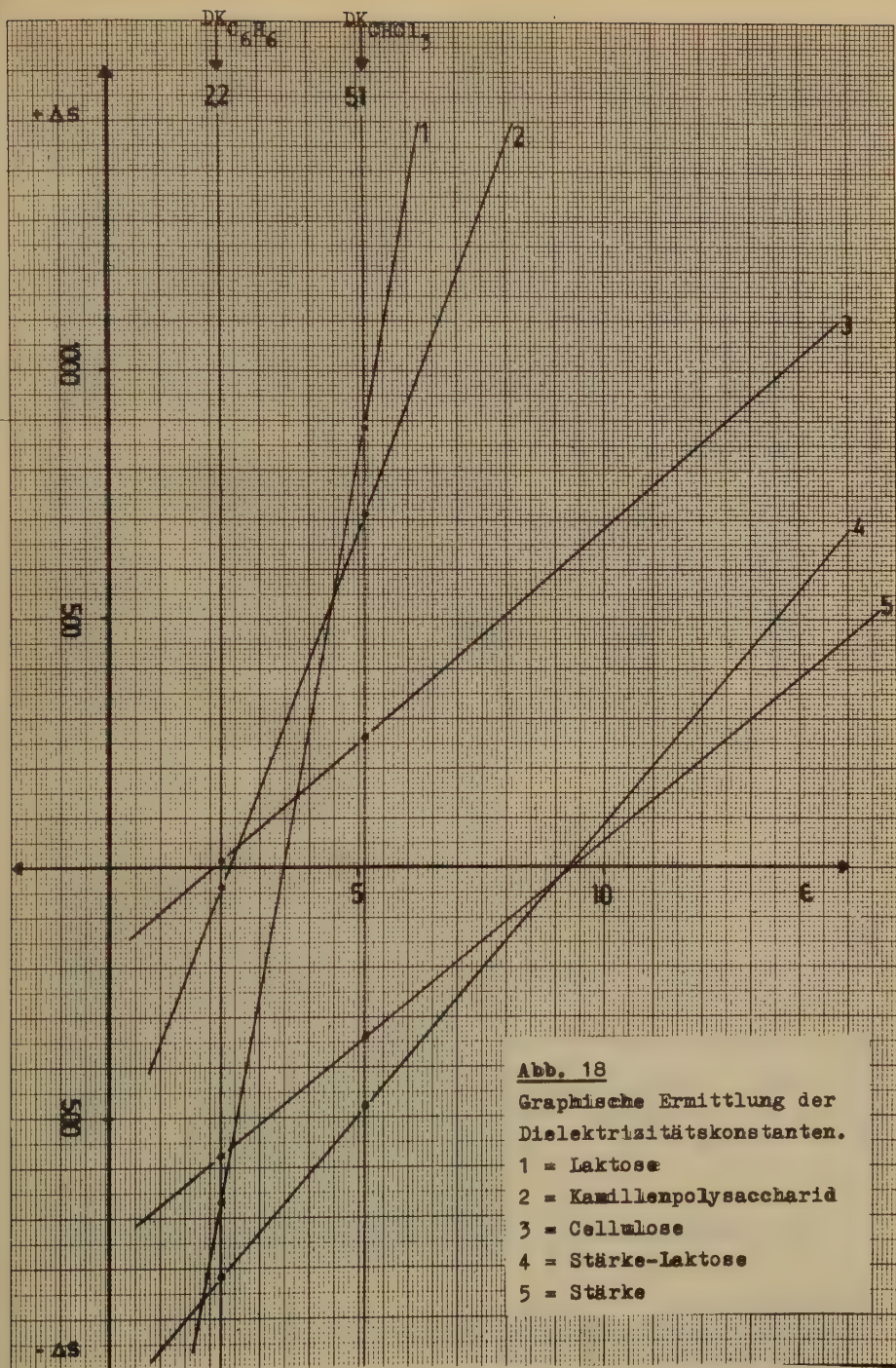
Tab. 3

Ergebnisse der mit Ribose als Bezugsszucker durchgeführten quantitativen Bestimmung.

Rib.	Xyl.	Ara.	Gal.	Glu.	Rha.	Urons.	
1,76	1,47	0,68	1,05	0,49	0,12	2,96	ml 0,01 n NaOH
0,66	0,55	0,254	0,38	0,177	0,05	1,15	mg Zucker im Eluat
32,0	26,8	12,3	18,4	8,6	2,4	55,6	mg Zucker im Hydrolysat
-	21	10	15	7	2	45	% Zucker im Schleim

4.3 Einige chemische Eigenschaften des Schleimes

- 1.) der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl beträgt 1,38%
(2,5 ml 0,01 n HCl bei einer Einwaage von 25,4 mg).
- 2.) Die Asche wurde als Sulfatasche zu <0,8% bestimmt.
- 3.) OCH_3 -Gehalt: Bei einer Einwaage von 20,5 mg Substanz wurde nach der Zeisel-Vieböck-Methode (73) 4,61% OCH_3 gefunden.
- 4.) Äquivalentgewichtsbestimmung:
40 mg Schleim in wässriger Lösung wurden mit 0,01 n NaOH gegen Methylrot titriert. Der Verbrauch von 7,5 ml 0,01 n NaOH entspricht einem Äquivalentgewicht von 533 (d.h. 533 g des Polysaccharidmaterials sind einem Mol NaOH = 39,99 g äquivalent).
- 5.) Karboxyl- und Uronsäureanhydrid-Gehalt:
 - a) Acidimetrisch: Aus der Äquivalentgewichtsbestimmung folgt ein COOH -Gehalt von 8,44% und ein Uronsäureanhydridgehalt (Molekulargewicht = 176,1) von 33,3%.
 - b) Durch Decarboxylierung: 200 mg wurden in 100 g 18%iger Salzsäure 2 Std. lang am Rückflußkühler decarboxyliert. Durch CO_2 -freie Luft (50%ige KOH-Vorlage) wurde das gebildete Kohlendioxyd in eine Bariumhydroxyd-Vorlage (30 ml = 17,85 ml 0,1 n HCl) getrieben, das Bariumkarbonat abfiltriert und die Bariumhydroxydlösung mit 0,1 n HCl zurücktitriert. Der Bariumhydroxydverbrauch entspricht 9,65 ml 0,1 n HCl und damit einem Uronsäureanhydridgehalt von 42,5%. (1 ml 0,1 n HCl = 2,2 mg CO_2 oder 8,8 mg Uronsäureanhydrid.)
- 6.) Verhalten gegenüber Farbstoffen (115):
Durch Zugabe von 1 ml 0,1%iger Methylenblaulösung zu 5 ml einer 0,25%igen Schleimlösung trat keine Fällung ein. Auch bei anderen Konzentrationen des Farbstoffes oder des Polysaccharids konnte kein Niederschlag erhalten werden.



4.4 Einige physikalische Eigenschaften des Schleimes

4.4.1 IR-Absorption

Das IR-Absorptionsspektrum von Gummi arabicum und Kamillenschleim (in Form von KBr-Preßlingen, 0,5%) wurde in einem Perkin-Elmer-Doppelstrahlspektrometer mit NaCl-Prisma aufgenommen (Kamillenschleimspektrum s. Abb. 19)

Beide Kurven zeigen bei 890 cm^{-1} ($11,25\mu$) bzw. 900 cm^{-1} ($11,1\mu$) ein schwach ausgeprägtes Absorptionsmaximum.⁺)

4.4.2 Dielektrizitätskonstante

Die DK-Messung erfolgte im WTW-Dekameter⁺⁺⁾ mit der Meßzelle MZE 13 T bei einer Temperatur von 20°C . Benutzt wurde die Immersionsmethode nach H. S T A R K E (18). Zunächst wurde der Meßwert des Lösungsmittels (Meßwert s_1), dann der Meßwert einer Suspension von 10 g Substanz in 10 ml Lösungsmittel gemessen (s_2). Die Auswertung erfolgte graphisch mit der Differenz $\Delta s = s_1 - s_2$, wobei Δs beim Erreichen der gesuchten DK Null wird. Benutzte Vergleichslösungsmittel waren Chloroform (DK = 5,1) und Benzol (DK = 2,2).

Tab. 4 Meßwerte der DK-Bestimmung

Immersions- flüssigk. (s_1)	Kartoffel- stärke		Cellulose ⁺⁺⁺⁾		Schleim		Laktose		Stärke- Laktose	
	s_2	Δs	s_2	Δs	s_2	Δs	s_2	Δs	s_2	Δs
CHCl_3 : 7670	8008	-338	7410	+260	6960	+710	6780	+890	8150	-480
C_6H_6 : 3880	4457	-577	3870	+ 10	3920	- 40	4550	-670	4700	-820
DK	9,0		2,0		2,4		3,5		9,0	

Die graphische Darstellung in Abb.18 zeigt die Auswertung der Meßergebnisse.

⁺) Herrn Dipl.Phys. Suhr von der Firma FARBERWERKE HOECHST A.G. sei für die Messung und Diskussion gedankt.

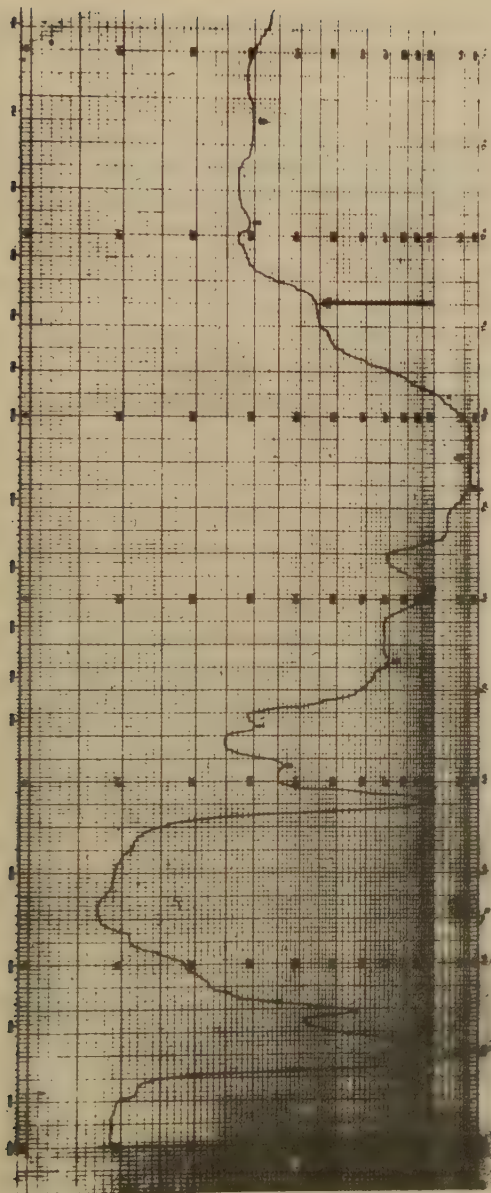
⁺⁺⁾ Firma WTW, Weilheim/Obb.

⁺⁺⁺⁾ Die Messung wurde abweichend mit 5g in 10ml durchgeführt.

Abb. 19

Das IR-Absorptionsspektrum des Kamillenschleims.

(Der Pfeil zeigt das für β -Glykoside typische Absorptionsmaximum.)



4.5 Periodatoroxydation

4.5.1 Ameisensäurebestimmung

Die vorgesehene Schleimmenge wurde in 150 ml Wasser gelöst, die Lösung gegen Methylrot neutralisiert, die NaJO_4 -Menge - in 50 ml Wasser gelöst - hinzugegeben und das Ganze auf 250 ml aufgefüllt.

Zu verschiedenen Zeiten wurden 10 ml-Proben entnommen, 2 ml Äthylenglykol hinzugesetzt und nach 5 Min. mit 0,01 n NaOH gegen Methylrot titriert. (1 ml 0,01 n NaOH entspricht 0,46 mg HCOOH) Eine gleichlaufende Blindprobe ohne Polysaccharidzusatz ergab den Korrekturwert.

Die unterschiedlichen Versuchsbedingungen und die Abhängigkeit zwischen der Zeit und den pro Anhydrozuckereinheit gebildeten Mol Ameisensäure zeigt die Tab. 5 .

4.5.2 Natriumperjodatbestimmung

Neben gleichzeitiger HCOOH -Bestimmung diente eine zweite 10 ml-Probeentnahme zur Analyse des NaJO_4 -Verbrauchs. Die Probe wurde mit 0,1 n NaOH gegen Phenolphthalein auf pH 8,0 eingestellt, 2,0 g festes Natriumbikarbonat und 5 ml 0,2 n Natriumarsenit-Lösung und 1 ml 20%ige Kaliumjodid-Lösung hinzugegeben. Nach 15 Min. konnte der Überschuß Arsenit mit 0,1 n Jodlösung mit Stärke als Indikator zurücktitriert werden (41).

(1 ml 0,2 n NaAsO_2 -Lösung entspricht 1 ml 0,1 n NaJO_4 bzw. 0,0214 g NaJO_4)

Die unterschiedlichen Versuchsdaten und die verbrauchten Mol NaJO_4 pro Anhydrozuckereinheit gehen aus der Tab. 6 hervor.

Tab. 5 Die Ameisensäurebildung bei unter verschiedenen Bedingungen durchgeführten Perjodatoxydationen⁺)

Ansatz-Nr.	Schleim i.mg	NaJO ₄ i.Mol/AZE	NaJO ₄ -Konzentrationen
1	120	4,0	0,012 m
2	126	3,8	0,012 m
3	120	3,9	0,012 m
4	121	4,8	0,015 m
5	124	2,7	0,009 m
6	132	1,9	0,006 m
7	254	4,0	0,025 m
8	120	2,9	0,009 m
9	120	5,0	0,015 m
10	120	4,0	0,012 m

Stunden:	3	8	12	16	24	30	48	54	72	100	>200
Ansatz-Nr.	HCOOH i.Mol/AZE										
1	0,16	0,19	0,22	0,25	0,25	0,26	0,26	0,28	0,29	0,30	0,34
2	0,15	0,18	0,20	0,22	0,24	0,24	0,24	0,25	0,25	0,29	0,32
3	0,15	0,21	0,23	0,26	0,27	0,26	0,26	0,26	0,26	0,29	0,33
4	0,16	0,19	0,21	0,22	0,24	0,25	0,25	0,27	0,28	0,29	0,32
5	0,13	0,16	0,18	0,19	0,21	0,23	0,23	0,24	0,26	0,27	0,28
6	0,09	0,12	0,14	0,16	0,17	0,18	0,20	0,21	0,23	0,24	0,26
7	0,14	0,19	0,20	0,21	0,22	0,25	0,27	0,27	0,28	0,29	0,30
8	0,16	0,18	0,20	0,23	0,25	0,25	0,25	0,25	0,28	0,30	0,33
9	0,16	0,17	0,19	0,22	0,24	0,25	0,27	0,27	0,27	0,30	0,34
10	0,14	0,18	0,21	0,24	0,25	0,26	0,26	0,26	0,28	0,30	0,32

⁺) Der Berechnung ist ein mittleres Molekulargewicht des Zuckeranhydrids von 158 zugrunde gelegt.

Tab. 6 Perjodatverbrauch bei den verschiedensten Oxydationsbedingungen⁺⁾

Ansatz-Nr.	NaJO ₄ i.Mol/AZE	NaJO ₄ -Konzentration	NaJO ₄ -Verbrauch im Endpunkt i.Mol/AZE
1	4,0	0,012 m	0,97
2	3,8	0,012 m	0,95
3	3,9	0,012 m	0,85
4	4,8	0,015 m	0,90
5	2,7	0,009 m	0,82
6	1,9	0,006 m	-
7	4,0	0,025 m	1,0
8	2,9	0,009 m	0,90
9	5,0	0,015 m	1,0
10	4,0	0,012 m	0,95

Stunden:	3	8	12	16	24	30	48	54	72	100	>200
Ansatz-Nr.	NaJO ₄ -Verbrauch i.Mol/AZE										
1	0,48	0,70	0,75	0,85	0,97	0,97	0,99	1,00	1,00	1,10	1,30
2	0,60	0,80	0,85	0,90	0,90	0,95	0,95	1,00	1,20	1,30	1,50
3	0,50	0,60	0,70	0,80	0,85	0,85	0,85	0,90	0,90	1,00	1,20
4	0,60	0,65	0,70	0,80	0,90	0,90	0,90	0,95	1,00	1,00	1,60
5	0,50	0,58	0,65	0,70	0,82	0,82	0,84	0,85	0,85	0,90	1,14
6	0,50	0,60	0,68	0,70	0,88	0,90	1,00	1,00	1,20	1,30	1,50
7	0,45	0,75	0,82	0,80	0,84	0,86	0,90	0,90	0,99	1,06	1,20
8	0,50	0,60	0,72	0,83	0,85	0,85	0,88	0,92	0,90	1,00	1,35
9	0,55	0,60	0,75	0,80	0,93	0,93	0,97	1,00	1,10	1,35	1,42
10	0,40	0,56	0,56	0,60	0,80	0,85	0,93	1,04	1,05	1,20	1,30

⁺⁾ Den Berechnungen ist ein mittleres Zuckeranhydrid-Molekulargewicht von 158 zugrunde gelegt.

4.5.3 Qualitative und quantitative Bestimmung der Hydrolyseprodukte des oxydierten Schleimes

Qualitative Bestimmung:

238 mg Schleim, in 150 ml Wasser gelöst, wurden gegen Methylrot mit 3,95 ml 0,1 n NaOH neutralisiert. Nach Zugabe von 1,28 g Natriummetaperjodat, gelöst in 50 ml Wasser, wurde auf 250 ml aufgefüllt. (NaJO_4 -Konzentration = 0,024 m; NaJO_4 -Überschuß = 4,07 Mol pro Anhydrozuckereinheit.) Die HCOOH -Bestimmung (s.S.80) nach 72 Std. zeigt den Endpunkt der selektiven Spaltung und ergibt eine HCOOH -Bildung von 0,29 Mol pro Anhydrozuckereinheit.

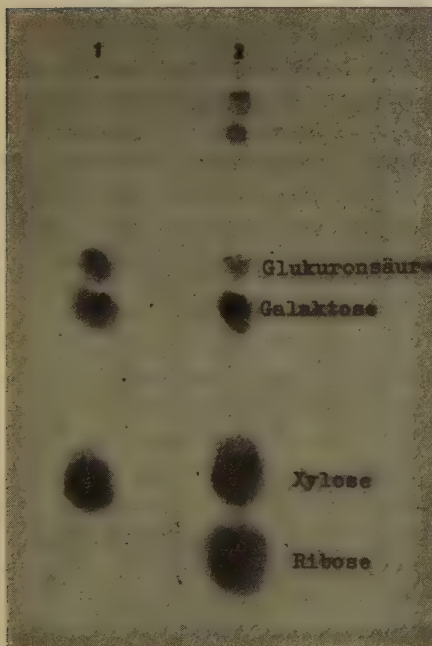


Abb. 20

Papierchromatographische
Trennung der Hydrolyse-
produkte des nichtoxydier-
ten Schleimanteils.
(absteigend, Fließmittel
n-Butanol-Eisessig-Wasser
4:1:1, 60 Std.)

1 = Vergleichszucker:
Glukuronsäure,
Galaktose,
Xylose

2 = Oxoschleimhydrolysat
mit Ribosezusatz

Die Zuckerflecken wurden
zur besseren Erkennung
verstärkt.

Die Oxydationslösung wurde zur Unterbrechung der Reaktion mit Glykol versetzt (10 ml) und gegen fließendes Wasser dialysiert (3 Tage). Nach dem Eindampfen wurde mit 30 ml $2\text{n H}_2\text{SO}_4$ hydrolysiert (1,5 Std., 100°C), mit Bariumkarbonat

neutralisiert und eingedampft.

Papierchromatographische Trennung (absteigend, Fließmittel c, 60 Std.) ergab die Anwesenheit von Xylose, Galaktose und wenig Uronsäure (Abb. 20).

Quantitative Bestimmung:

Zur quantitativen Bestimmung wurden 284 mg Schleim mit Perjodat oxydiert, gereinigt und hydrolysiert, wie bei der qualitativen Bestimmung beschrieben wurde. Nach Zugabe von 20 mg Ribose wurde neutralisiert, eingedampft und papierchromatographisch (absteigend, Fließmittel b, 68 Std.) getrennt. (12)

Nach der Elution der Zucker wurde die quantitative Bestimmung nach dem Perjodatverfahren (11) durchgeführt. (siehe auch S. 74) Es ergaben sich folgende Werte:

Tab. 7 Quantitative Bestimmung der nichtoxydierten Zuckeranteile

Rib.	Xyl.	Gal.	Urons.	
0,28	0,3	0,08	0,22	ml 0,01 n NaOH
0,129	0,138	0,037	0,1	mg HCOOH
0,105	0,112	0,033	0,085	mg Zucker im Eluat
20,0	21,5	6,3	16,0	mg Zucker im Gesamt-Hydrolysat ⁺⁾
-	7,4	2,2	5,6	% des nichtoxydierten Schleims

(1 ml 0,01 n NaOH entspricht 0,46 mg HCOOH bzw. 0,375 mg Pentose bzw. 0,36 mg Hexose bzw. 0,388 mg Hexuronsäure)

⁺⁾ Aus dem Verhältnis zwischen der im Eluat gefundenen Ribosemenge und der Gesamttribosemenge (20 mg) lassen sich auch die im Hydrolysat vorhandenen übrigen Zuckermengen errechnen.

4.5.4 Herstellung und Analyse des INH-Oxoschleim-Polymers (50)

202,0 mg Polysaccharid wurden in Wasser gelöst, die Lösung mit 0,1 n NaOH gegen Methylrot neutralisiert und nach Zugabe von 1,59 g NaJO_4 in wässriger Lösung, Auffüllen auf 250 ml wurde 72 Stunden lang oxydiert. (NaJO_4 -Überschuß = 4 Mol NaJO_4 /Anhydrosuckereinheit)

Nach Zugabe von 0,85 g Isonicotinsäurehydrazid in 50 ml Wasser gelöst zu 50 ml der Oxydationslösung fiel ein weißes amorphes Präzipitat aus. (C = 45,0%, H = 5,7%, N = 11,1%)

4.5.5 Molekulargewichtsbestimmung nach Perjodatspaltung (51,52,53)

250 mg Schleim in wässriger Lösung wurden gegen Methylrot mit 0,1 n NaOH (4,3 ml) neutralisiert. Nach Zugabe von 1,33 g NaJO_4 in Wasser gelöst wurde auf 250 ml aufgefüllt. (4 Mol NaJO_4 -Überschuß, NaJO_4 -Konzentration = 0,025 m) 2 ml-Proben wurden mit 1 ml m NaAsO_2 -Lösung und 1 ml n H_2SO_4 versetzt. Nach 5 Min. wurde die Lösung nach Zusatz von 10 ml Chromotropsäure-Lösung (53) 30 min. lang auf 100°C erhitzt, und gegen eine Blindprobe im Elco II mit Grünfilter S 52/53 das entstandene Formaldehyd photometrisch bestimmt.

Tab. 8 Formaldehyd-Meßwerte

Zeit i.Std.	1	4	12	24	48	60
E	0,99	0,135	0,14	0,15	0,14	0,15

Zur Aufstellung der HCHO-Eichkurve (Abb.21) dienten Formaldehydmengen, die in Glukoselösungen durch Perjodatspaltung gebildet wurden, wobei die Oxydation unter den gleichen Bedingungen wie oben durchgeführt wurde.

Tab. 9 Meßwerte der HCHO-Eichkurve

μg Gluk.	300	210	180	150	120	60	30
μg HCHO	50	35	30	25	20	10	5
E	0,31	0,224	0,195	0,168	0,130	0,084	0,054

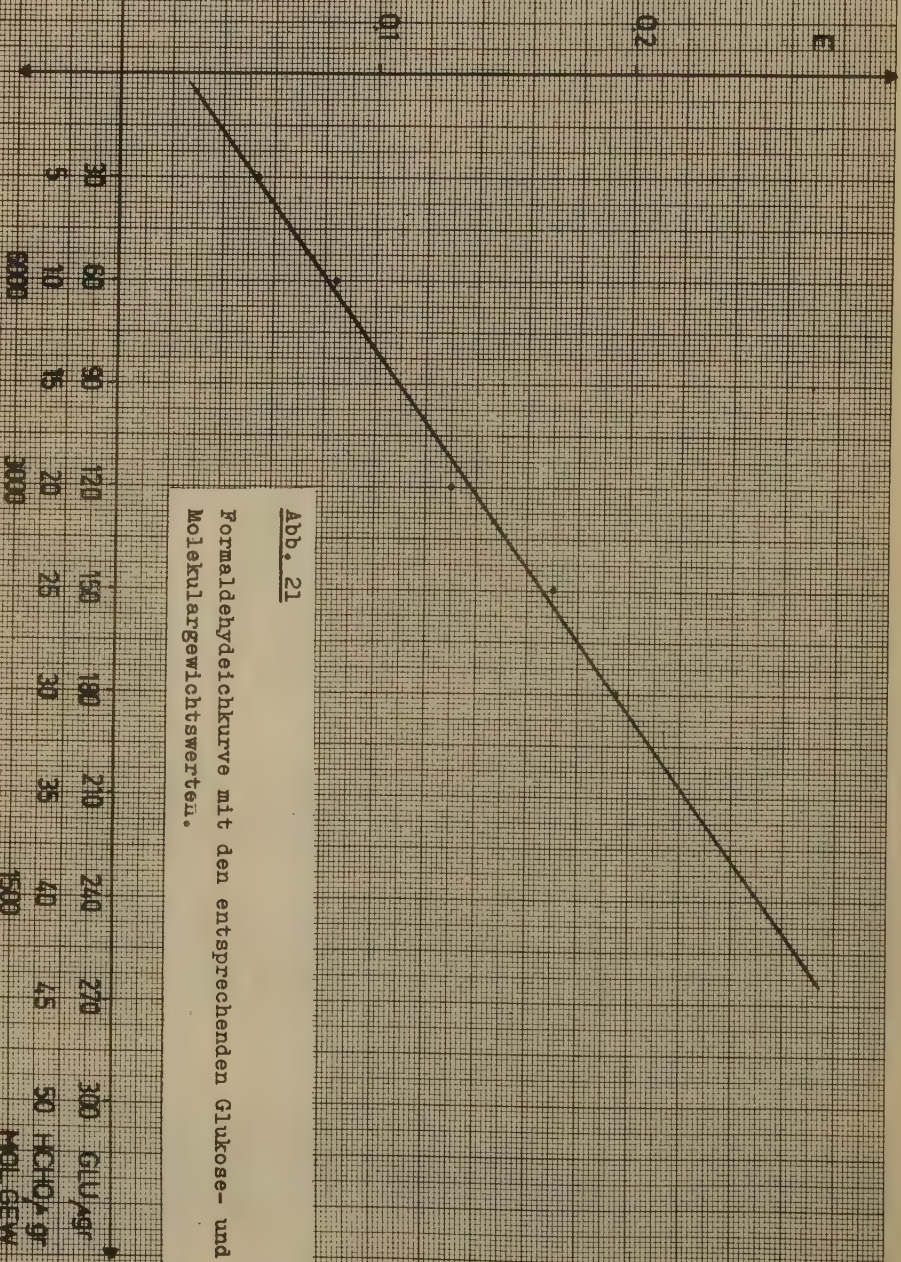


Abb. 21

Formaldehydickurve mit den entsprechenden Glukose- und Molekulargewichtswerten.

30 60 90 120 150 180 210 240 270 300 GLU/gf
 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 HCHO/g
 6000 1500 MOL GEW.

Wie aus der Eichkurve (Abb. 21) hervorgeht, entspricht die gemessene Extinktion von 0,14-0,15 einer Formaldehydmenge von 20-22 μ g.

Aus der Verhältnisgleichung

$$\begin{array}{rclclcl} \text{MG}_{\text{HCHO}} & : & \text{HCHO} & = & \text{MG}_{\text{Schleim}} & : & \text{Einwaage}_{\text{Schleim}} \\ 30 & : & 0,00002 \times 125 & = & x & : & 0,25 \\ 30 & : & 0,0025 & = & x & : & 0,25 \end{array}$$

ergibt sich ein Schleim-Molekulargewicht von 3 000.

4.6 Acetylierung des Schleimes

10 g Polysaccharid wurden in Pyridin (150 ml) dispergiert und unter Rühren in Anteilen mit 125 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 3stündigem Erhitzen am Rückflußkühler auf dem Wasserbad und 48stündiger Einwirkung bei Raumtemperatur fiel aus einer Probe mit Eiswasser eine braune, in kaltem Wasser, Chloroform und Äther unlösliche, in Aceton lösliche Masse aus. Der Gesamtansatz wurde mit Eiswasser behandelt, und die Fällung wurde abgesaugt und gewaschen. (Ausbeute: 6,5 g mit 30,2% Acetyl)

Nach zweimaliger Reacetylierung resultierten 4,0 g Polysaccharidacetat (Acetylgehalt: 36%).

Die Acetylgehaltsbestimmung wurde nach zwei verschiedenen Verfahren durchgeführt:

- 1.) 0,107 g Acetat wurden nach Zugabe von 5 ml Äthanol mit 20 ml 0,1 n NaOH 1 Std. lang am Rückflußkühler verseift. Die Rücktitration des NaOH-Überschusses mit 0,1 n HCl ergab nach Blindwertkorrektur einen Verbrauch von 9,2 ml 0,1 n NaOH, was einem Acetylgehalt von 36% entspricht. (1 ml 0,1 n NaOH entspricht 0,004 g Acetyl) (60)
- 2.) 0,099 g Schleim wurden nach Quellung in 5 ml 75%igem Äthanol mit 20 ml 0,1 n NaOH 30 Std. lang bei Zimmertemperatur verseift. Die Rücktitration mit 0,1 n HCl ergab einen Verbrauch von 8,8 ml 0,1 n NaOH. Der Acetylgehalt betrug 35,6%. (13)

Durch erneute Acetylierung konnte der Acetylgehalt nicht erhöht werden.

4.7 Die Methylierung

Methylierung des Acetats:

4 g Polysaccharidacetat wurden in 160 ml Aceton gelöst und diese Lösung in Anteilen unter starkem Rühren mit 80 ml Dimethylsulfat (MERCK) und 200 ml 30%iger Natronlauge versetzt. Durch Eiskühlung wurde die Reaktionstemperatur auf 40° C gehalten. Nach 1stündigem Erhitzen am Rückfluß auf 80° C wurde das Aceton abdestilliert und die Lösung 3 Tage lang gegen fließendes Wasser dialysiert. Nach dem Eindampfen im Vakuum wurde erneut methyliert. Nach dreimaliger Methylierung entstand ein O-Methylprodukt mit 19% OCH_3^+ . (Ausbeute: 2,4 g)

Direkte Methylierung des Schleimes:

10 g Polysaccharid wurden nach der Lösung in 150 ml Wasser unter starkem Rühren innerhalb von 3 Std. in Anteilen mit 200 ml Dimethylsulfat (MERCK) und 450 ml 30%iger Natronlauge versetzt. Durch Eiskühlung konnte die Temperatur auf 40° C gehalten werden, was zur Unterdrückung der Schaumbildung notwendig war. Nach weiterem 6stündigem Rühren, nach Dialyse gegen fließendes Wasser und nach dem Eindampfen des Dialysats wurde erneut methyliert. Nach weiteren 7 Methylierungen nach der beschriebenen Methode, wobei der Oxymethylgehalt von 8% auf 24% stieg, ergab ein erneuter Methylierungsversuch keinen weiteren Anstieg des OCH_3 -Gehalts.

Nach erschöpfender Dialyse in Fließwasser (14 Tage lang) und Eindampfen resultierten 4,7 g des O-Methylproduktes (OCH_3 : 24%).

4.8 Methanolyse und Hydrolyse des O-Methylproduktes

Beide Oxymethylprodukte wurden 5 Std. lang am Rückflußkühler mit 200 ml methanolischer Salzsäure auf dem Wasserbad

⁺) Die Oxymethylbestimmungen wurden nach der Ziesel-Vieböck-methode (73) mit Einwaagen von 15-30 mg durchgeführt, wobei 1 ml 0,1 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung 0,51706 mg OCH_3 entspricht.

behandelt. Nach dem Eindampfen auf 5 ml wurde mit 200 ml 0,5 n HCl 3 Std. lang am Rückflußkühler hydrolysiert. Frisch aus Silbernitratlösung mit Natriumkarbonat gefälltes Silberkarbonat neutralisierte nach dem Erkalten die Salzsäure. Nach dem Abfiltrieren des ausgefallenen Silberchlorids wurde Schwefelwasserstoff eingeleitet, das Silbersulfid abfiltriert und das Filtrat eingedampft. (Ausbeute: 1,6 bzw. 3,8 g eines gelblichen Sirups.)

4.9 Trennung und Isolierung der O-Methylzucker

4.9.1 Papierchromatographische Untersuchung des O-Methylzuckergemischs

Aufsteigende (Abb. 16 und 22) und absteigende (Abb. 23) papierchromatographische Trennungen (Fließmittel b, 8 Std.) ergaben nach Besprühen mit Anilinphthalatreagens die Anwesenheit von 4 Fraktionen:

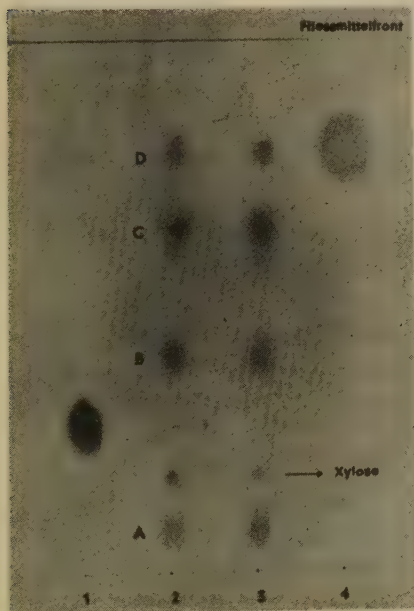


Abb. 22

Papierchromatographische Trennung des O-Methylzuckergemischs. (Aufsteigend, Fließmittel n-Butanol-Äthanol-Wasser 4:1:5, 16 Std.)

1 = 3-O-Methylglukose

2) = O-Methylzuckergemisch

4 = 2,3,4,6-Tetra-O-methylglukose

Fraktion A	$R_{TMG} < 0,3$	hellrote Farbe
Fraktion B	$R_{TMG} = 0,45$	braune Farbe
Fraktion C	$R_{TMG} = 0,8$	braunrote Farbe
Fraktion D	$R_{TMG} = 0,95$	braunrote Farbe

Bei hoher Dosierung auf dem Papier zeigt die absteigende und aufsteigende Trennung (Fließmittel b, 16 Std.) die Anwesenheit von Spuren Xylose im O-Methylzuckergemisch (Abb. 22). Beim Besprühen der mit 3-O-Methylglukose und 2,3,4,6-Tetra-O-methylglukose als Vergleiche entwickelten Chromatogramme mit α -Naphthylamintrichloracetatlösung (77) zeigt die Fraktion C eine grüne Farbe. Die Benutzung von p-Anisidin, Dimethylanilin und Diphenylamin ergaben keine oder nur schwache spezifische Farbreaktionen.

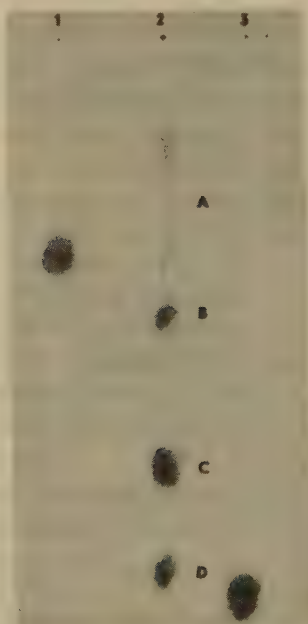


Abb. 23 absteigende papierchromatographische Trennung (Fließmittel b, 16 Std.)

- 1 = 3-O-Methylglukose
- 2 = Oxymethylzuckergemisch
- 3 = 2,3,4,6-Tetra-O-methylglukose

Die Flecken wurden zur besseren Erkennung verstärkt.

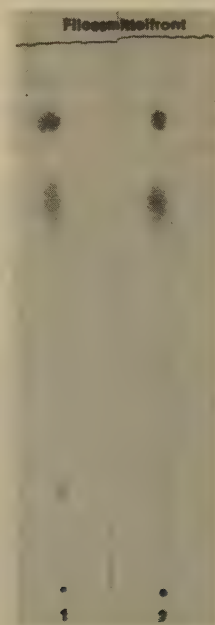


Abb. 24 aufsteigende papierchromatographische Trennung

- 1 = saures Fließmittel c
- 2 = neutrales Fließmittel b

Der R_{TMG} -Wert beträgt nach Trennung in neutralem Fließmittel b 0,1-0,3 und nach Trennung im sauren Fließmittel c 0,75-0,85 (Abb. 24).

4.9.2 Papierelektrophoretische Trennung der O-Methylzucker

Das O-Methylzuckergemisch konnte papierelektrophoretisch unter Benutzung von Glukose und 2,3,4,6-Tetra-O-methylglukose als Vergleichssubstanzen in 4 Fraktionen aufgetrennt werden:

Fraktion 1	M_G	= 0,0
Fraktion 2	M_G	= 0,2
Fraktion 3	M_G	= 0,5
Fraktion 4	M_G	= 0,65

Aus den mit Anilinphthalat entstandenen Farben ergibt sich, daß die Fraktion 3 und Fraktion 4 aus O-Methyluronsäuren bestehen und damit Bestandteile der Papierfraktion A sind.

4.9.3 Herstellung von Vergleichs - O-Methylzuckern

Je 3 g Xylose, Arabinose, Glukose, Galaktose und D-Glukuronsäurelaktone (83) wurden mit 60 ml Dimethylsulfat und 60 ml 30%iger Natronlauge nach genannter Methode methyliert. Die Methylierungslauge wurde mit Chloroform extrahiert, der Extrakt eingedampft und der Rückstand mit n Schwefelsäure 3 Std. lang bei 100° C hydrolysiert. Nach der Neutralisation mit Bariumkarbonat und dem Eindampfen ergaben papierchromatographische Trennungen (aufsteigend, Fließmittel b, 16 Std.) die Anwesenheit von O-Methylzuckern mit folgenden R_{TMG} -Werten: (Die R_{TMG} -Werte der Oxymethylglukuronsäuren wurden in saurem Fließmittel c gemessen.)

R_{TMG} -Werte der O-Methylxylosen	= 0,44 - 0,75 - 0,98
R_{TMG} -Werte der O-Methylarabino- sen	= 0,65 - 0,83 - 0,98
R_{TMG} -Werte der O-Methylglukosen	= 0,37 - 1,0
R_{TMG} -Werte der O-Methylgalaktosen	= 0,52 - 0,73 - 0,88
R_{TMG} -Werte der O-Methylglukuronsäuren	= 0,48 - 0,87

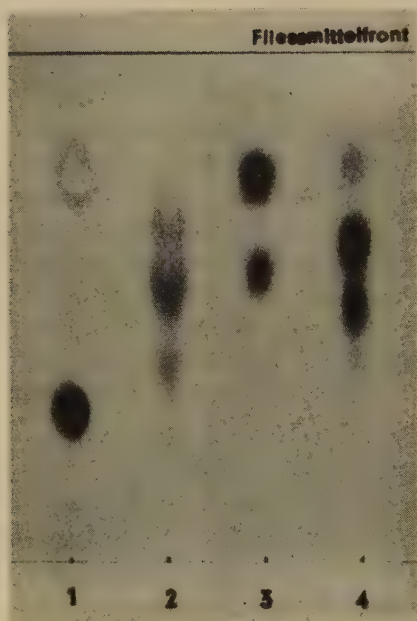


Abb. 25

Papierchromatographisches Verhalten der hergestellten Vergleichs-O-Methylzuckergemische.

(aufsteigend, Fließmittel n-Butanol-Äthanol-Wasser 4:1:5, 5 Std.)

- 1 = O-Methylglukosen
- 2 = O-Methylgalaktosen
- 3 = O-Methylxylosen
- 4 = O-Methylarabinosen

Durch Vergleich mit den in der Literatur angegebenen R_{TMG} -Werten (78,79,80) lassen sich die R_{TMG} -Werte O-Methylzuckern mit bestimmtem Methylierungsgrad zuordnen, die damit als Vergleichssubstanzen benutzt werden können.

R_{TMG} -Werte

0,44	Mono-	}	O-methylxylose
0,72	Di-		
0,96	Tri-		
0,65 u. 0,83	Di-	}	O-methylarabinose
0,96	Tri-		
0,52	Di-	}	O-methylgalaktose
0,73	Tri-		
0,9	Tetra-		
0,28	Mono-	}	O-methylglukose
1,0	Tetra-		
0,48	Di-	}	O-methylglukuronsäure
0,87	Tri-		

4.9.4 Säulenchromatographische Trennung der O-Methylzucker

4.9.4.1 Trennung des nichtvorgetrennten Gemisches:

0,29 g O-Methylzuckergemisch wurden an einer Cellulose-säule (60 x 3 cm, Cellulosepulver Schleicher u. Schüll Nr. 123) mit einem wassergesättigten Benzin (100-140°C) - n-Butanol-Gemisch (7:3 v/v) getrennt. Das Eluat wurde nach Durchlauf von Sudanrot (R_{TMG} -Wert >1,0) mit Hilfe eines Fraktionssammlers als "30-Minuten-Fractionen" (18 ml) aufgefangen. Nach Durchlauf von 100 Fractionen wurde mit Benzin (100°-140° C)-n-Butanol (1:1) und nach Durchlauf von weiteren 20 Fractionen mit n-Butanol und dann mit Wasser eluiert. Die 150 Fractionen wurden eingedampft und die papierchromatographisch (aufsteigend, Fließmittel b, 16 Std.) identischen Fractionen zu 6 Hauptfractionen, die mit Ausnahme der Fraction 1 uneinheitlich sind, vereinigt.

Tab. 10 Daten der Fractionen der ersten säulenchromatographischen Trennung

Frakt.	Menge	$R_{TMG}^{+)}$	$R_{TMG}^{++)}$	M_G	Demethylierung
1	11 mg	0,95		0,0	Arabinose
2	34 mg	0,95	0,85	0,0	Arabinose
		0,92		0,0	Galaktose
		0,2		0,63	
3	50 mg	0,92	0,85	0,0	Galaktose
		0,2		0,63	
4	71 mg	0,79		0,0	Arabinose
		0,2		0,65	

⁺⁾ Gemessen in Fließmittel n-Butanol-Äthanol-Wasser (4:1:5)

⁺⁺⁾ Gemessen in Fließmittel n-Butanol-Eisessig-Wasser(4:1:1)

Tab. 10 Fortsetzung

Frakt.	Menge	R _{TMG} ⁺⁾	R _{TMG} ⁺⁺⁾	M _G	Demethylierung
5	78 mg	0,75 0,12	0,75	0,0 0,5	Galaktose
6	38 mg	0,75 0,5 0,12	0,75	0,0 0,15 0,5	Galaktose

In den wässrigen Nachlauffractionen konnten papierchromatographisch Spuren von Xylose nachgewiesen werden.

Die Demethylierung der Fraktionen wurde folgendermaßen durchgeführt (77):

Etwa 10 mg der Substanz wurden in 1 ml wässrigem Bromwasserstoff (48%) auf dem Wasserbad 5 Min. lang erhitzt, dann sofort mit 10 ml Wasser verdünnt, die Lösung mit frischbereitetem Silberkarbonat neutralisiert, mit Kohle entfärbt, filtriert, der Überschuß an Silber mit Schwefelwasserstoff gefällt, filtriert, eingedampft und papierchromatographisch (absteigend, Fließmittel b, 72-100 Std.) in O-Methylzucker und unsubstituierte Zucker getrennt.

4.9.4.2 Trennung des vorgetrennten O-Methylzuckergemisches

1,2 g O-Methylzuckergemisch wurden mit 50 ml 0,2 n Ba(OH)₂ 5 Std. lang bei 80° C erhitzt, der Überschuß an Barium mit CO₂ gefällt, abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Dieses ergab nach Chloroformextraktion zwei Fraktionen: Fraktion A mit chloroformlöslichem Anteil (0,3 g) und Fraktion B mit chloroformunlöslichem Anteil (0,73 g), die die Bariumsalze der O-Methylhexuronsäuren enthält.

Die Fraktion A konnte an der Cellulose-Säule (60 x 3 cm, Cellulose-Pulver Schleicher u. Schüll Nr. 123) mit wassergesättigtem Benzin (100°-140° C)- n-Butanol-Gemisch (7:3)

+)

++) siehe Fußnote S. 93

getrennt werden. Das Eluat wurde in "15-Minuten-Faktionen" (10 ml) aufgefangen. Nach Durchlauf von 180 Fraktionen wurde n-Butanol und nach Durchlauf von 200 Fraktionen Wasser als Eluierungsmittel benutzt. Es resultierten 250 Fraktionen, die papierchromatographisch untersucht wurden (aufsteigend, Fließmittel b, 16 Std.). Nach Vereinigung der identischen Eluate ergaben sich 8 Fraktionen (Fraktionen 1 - 8).

Die Fraktion B wurde durch Kationenaustauscher (MERCK I) geschickt und dann nach der oben beschriebenen Methode an der Säule getrennt (0,71 g). Nach papierchromatographischer Untersuchung der Eluate (aufsteigend, Fließmittel c, 16 Std.) konnten die 220 Fraktionen zu 3 Hauptfraktionen vereinigt werden (Fraktionen a, b und c).

4.9.5 Untersuchung der Säulenfraktionen

Fraktion 1 (32 mg)

Diese Fraktion erwies sich als papierchromatographisch (aufsteigend, Fließmittel b, 16 Std.) einheitlich. (R_{TMG} -Wert = 0,95) Durch Demethylierung konnte papierchromatographisch Arabinose nachgewiesen werden. (absteigend, Fließmittel a und b, 60 bzw. 72 Std.)

Fraktion 2 (10 mg)

Papierchromatographische Untersuchungen (aufsteigend, Fließmittel b, 16 Std.) ergaben die Anwesenheit von zwei O-Methylzuckern (R_{TMG} = 0,95 bzw. 0,92). Galaktose und Arabinose wurden nach Demethylierung der Fraktion erkannt (absteigend, Fließmittel a und b, 72 Std.).

Fraktion 3 (17 mg)

Diese Fraktion besteht nach R_{TMG} -Wert (0,92) und papierchromatographischem Vergleich (aufsteigend, Fließmittel b, 12 Std.) aus Tetra-O-methylgalaktose. Nach der Demethylierung konnte papierchromatographisch (absteigend, Fließmittel a, 90 Std.) Galaktose nachgewiesen werden.

Fraktion 4 (126 mg)

Die Fraktion 4 ist ebenfalls einheitlich ($R_{\text{TMG}} = 0,8$). Sie erwies sich nach papierchromatographischem Vergleich (aufsteigend, Fließmittel b, 16 Std.) identisch mit Tri-O-methylgalaktose. Nach Demethylierung ließ sich Galaktose papierchromatographisch nachweisen (absteigend, Fließmittel a und b, 100 Std.).

Fraktion 5 (16 mg)

Diese Fraktion besteht aus einem Gemisch der in Fraktion 4 und 6 vorhandenen O-Methylzucker ($R_{\text{TMG}} = 0,8$ bzw. $0,75$). Galaktose und Arabinose ließen sich im demethylierten Zuckergemisch papierchromatographisch nachweisen (absteigend, Fließmittel a und b, 96 Std.).

Fraktion 6 (78 mg)

Die Fraktion 6 ist einheitlich ($R_{\text{TMG}} = 0,75$) und papierchromatographisch identisch mit Vergleichs-Di-O-methylarabinose. Arabinose konnte nach Demethylierung der Fraktion papierchromatographisch (absteigend, Fließmittel a, 72 Std.) erkannt werden.

Fraktion 7 (12 mg)

Die Fraktion 7 ist in den Fließmitteln a, b und c papierchromatographisch einheitlich ($R_{\text{TMG}} = 0,45-0,5$). Nach Demethylierung konnte kein methoxylfreier Zucker nachgewiesen werden.

Fraktion 8 (16 mg)

Sie besteht aus Xylose ($R_{\text{TMG}} = 0,2$).

Fraktion a (180 mg)

Die Fraktion ist einheitlich und besteht nach papierchromatographischem Vergleich (aufsteigend, Fließmittel c, 16 Std.) aus Tri-O-methylglukuronsäure (Abb. 26). Der R_{TMG} -Wert beträgt im Fließmittel b $0,2-0,3$ und in saurem Fließmittel c $0,85$. Nach elektrophoretischer Wanderung ließ sich ein M_G -Wert von $0,65$ errechnen.

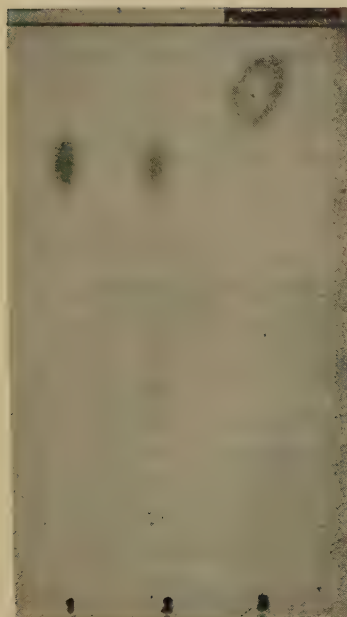


Abb. 26

Papierchromatographische
Identifizierung der vor-
handenen Tri-O-methylgluku-
ronsäure.

(aufsteigend, Fließmittel
n-Butanol-Eisessig-Wasser
4:1:1, 16 Std.)

- 1 = Fraktion a
- 2 = Tri-O-methylglukuron-
säure
- 3 = 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-
glukose

Fraktion b (131 mg)

Diese Fraktion ist einheitlich. Der R_{TMG} -Wert, in Fließ-
mittel b gemessen, beträgt 0,15-0,2 und 0,75, gemessen im
sauren Fließmittel c. Der M_G -Wert ist kleiner als der der
Fraktion a und läßt sich zu 0,5 berechnen.

Fraktion c (320 mg)

Die Fraktion c besteht aus einer teilweise methylierten
Aldobiuronsäure, deren Hydrolyse Xylose und die in Frak-
tion b vorhandene O-Methylglukuronsäure lieferte.

5 Zusammenfassung

1. Das in den Schleimdrüsen der Fruchtknoten von Flores Chamomillae enthaltene Polysaccharid wurde unter Anwendung von Fällungs- und Austauschverfahren in Anlehnung an schon bestehende Vorschriften praktisch aschefrei isoliert.
2. Die Versuche, die Alkalilabilität der Substanz weiter zu untersuchen, ergaben einen Hinweis auf eine weniger zeitraubende und billigere Gewinnung des Materials mit Bariumhydroxyd als Fällungsmittel.
3. Die qualitative Bestimmung der Zuckerbestandteile bestätigten die Anwesenheit von 5 neutralen Zuckern (Xylose, Arabinose, Galaktose, Glukose, Rhamnose) und von einem Hexuronsäurebestandteil. Die Uronsäure konnte durch Papierchromatographie der Säure und deren Trimethyläther als Glukuronsäure erkannt werden.
4. Der hohe Alkoxy-Gehalt des Schleimes ist durch veresterten oder eingeschlossenen Fällungsalkohol und nicht durch O-Methylzuckerbausteine bedingt.
5. Die nach der Perjodatmethode durchgeführte quantitative Bestimmung der papierchromatographisch getrennten Bausteine lieferte mit den nach der photometrischen Methode gefundenen Ergebnissen übereinstimmende Werte. Die Substanz besteht aus 45% Glukuronsäure, 21% Xylose, 10% Arabinose, 15% Galaktose, 7% Glukose und 2% Rhamnose.
6. Die Molekulargewichtswerte, die aus dem osmotischen Druck und dem Verhalten gegenüber 3,5-Dinitrosalicylsäure folgten, konnten durch Messung des Sedimentationsgleichgewichtes in der Ultrazentrifuge und durch Formaldehydbestimmung nach der Perjodatoxydation bestätigt werden. Die Molekulargewichtswerte aller Bestimmungen liegen im Bereich von 3 500 - 4 200, was

einem Polymerisierungsgrad von ca. 27 entspricht.

7. Die Ergebnisse der IR-Absorptionsmessungen und die Dielektrizitätskonstante machen das vorherrschende oder ausschließliche Vorliegen von β -glykosidischen Verknüpfungen wahrscheinlich.
8. Die Ameisensäurebildung am Endpunkt der selektiven Perjodatoxydation beträgt 0,23 - 0,27 Mol pro Anhydrosuckereinheit, was auf ein verzweigtes Molekül hinweist und einen Endgruppengehalt von 23-27% fordert.
9. Der geringe NaJO_4 -Verbrauch nach selektiver Spaltung entspricht dem eines linearen Moleküls und ist durch das Vorliegen von Galaktose in 1,3-glykosidischer Bindung bedingt.
10. Arabinose, Glukose und Rhamnose werden von Perjodat quantitativ gespalten und müssen deshalb im Molekül α -Diol-Struktur besitzen.
11. Ein Teil der Xylose, ein Teil der Galaktose und ein Teil der Glukuronsäure sind einer Perjodatspaltung nicht zugänglich und müssen daher als Verzweigungsgruppen oder als Kettenglieder ohne α -Diolstruktur vorliegen.
12. Die reduzierende Endgruppe besteht aus einem Hexose- oder Pentofuranose-Rest, da das Molekulargewicht, das aus der nach der Perjodatspaltung durchgeführten Formaldehydbestimmung folgt, mit den nach anderen Methoden ermittelten Molekulargewichten recht gut übereinstimmt.
13. Der α -Diolzucker-Gehalt des Schleimes, der sich aus der Stickstoffbestimmung des Isonicotinsäurehydrazid-Oxoschleimpolymers ergibt, ist ebenfalls durch die vorhandene Galaktose in 1,3-glykosidischer Bindung niedriger als aus anderen Ergebnissen erwartet wird.

14. Der Acetylgehalt des vollacetylierten Moleküls entspricht etwa dem theoretischen Wert (38% Acetyl; 25% OH).
15. Das Polysaccharid und sein Acetat wurden durch mehrmalige Anwendung der Dimethylsulfatmethode nahezu erschöpfend methyliert und das O-Methylprodukt nach Methanolyse zu den reduzierenden O-Methylzuckern hydrolysiert.
16. Das O-Methylzuckergemisch besteht, wie papierchromatographische Trennungen ergaben, aus mindestens einer sauren und drei neutralen O-Methylzuckerfraktionen.
17. Die saure Fraktion erwies sich papierelektrophoretisch als uneinheitlich und konnte in zwei Fraktionen aufgetrennt werden.
18. Nach säulenchromatographischer Trennung sowohl des neutralen als auch des sauren O-Methylzuckeranteils resultierten 11 Fraktionen.
19. Durch papierchromatographische Untersuchungen mit Vergleichs - O-Methylzuckern und durch Demethylierung der Säulenfraktionen konnten folgende O-Methylzucker nachgewiesen werden:

Tri -O-methylarabinose
Tetra-O-methylgalaktose
Tri -O-methylgalaktose
Di -O-methylarabinose
Tri -O-methylglukuronsäure
Di -O-methylglukuronsäure

Außerdem wurden eine nicht identifizierte O-Methylzuckerfraktion ($R_{\text{TMG}} = 0,5$), Xylose und eine teilweise methylierte - aus Xylose und Di-O-methyluronsäure bestehende - Aldobiuronsäure gefunden. Die in der Biuronsäure enthaltene Di-O-methyluronsäure konnte als Di-O-methylglukuronsäure erkannt werden.

20. Methyläther der Glukose, Rhamnose und Xylose wurden nicht gefunden, was sich im Falle der 3-fach gebundenen Xylose (Verzweigungsgruppe) durch unvollständige, sterisch behinderte Methylierung und im Falle der im Schleim nur in geringer Menge vorhandenen Glukose und Rhamnose durch Verluste während der Methylierungsverfahren erklären läßt.

21. Die quantitativen Bestimmungen der O-Methylzucker ergaben einen Hinweis auf den verzweigten Charakter des Moleküls mit ca. 25% Endgruppen, was auch mit den Ergebnissen der Perjodatspaltung übereinstimmt.

22. Nach den Ergebnissen der Perjodatoxydation und der Methylierungsanalyse konnte den einzelnen Zuckerbestandteilen folgende Lage im Molekül zugeordnet werden:

Glukuronsäure	End- und Kettenglied
Xylose	Verzweigungsglied
Arabinose	End- und Kettenglied
Galaktose	End- und Kettenglied
Glukose	} wahrscheinlich Ketten- glieder, eine eindeutige Zuordnung ist nicht möglich.
Rhamnose	

23. Die verschiedenen Baumöglichkeiten des Moleküls wurden mit Hilfe eines nach den Ergebnissen möglichen Strukturbildes diskutiert (s.S. 67).

6 Literaturverzeichnis

- (1) E.L. Hirst Proc.Roy.Soc.(London) Ser.A
 252, 287
- (2) D.J. Manners Lectures, Monographs and Reports
 2 (1959). The Royal Institute of
 Chemistry, London
- (3) H. Bouveng Advances Carbohydrate Chem.
 B. Lindberg 15, 53 (1960)
- (4) T. Purdie J.chem.Soc. 83, 1021 (1903)
 I.C. Irvine
- (5) W.W. Haworth J.chem.Soc. 107, 8 (1915)
- (6) W. Kehr Dissertation, Frankfurt/M.(1960)

 H. Janecke versch. Veröffentlichungen
 W. Kehr im Druck
- (7) G.O. Aspinall J.chem.Soc. 1160 (1955)
 E.L. Hirst
 A. Wickstroem
- (8) E.L. Hirst J.chem.Soc. 189 (1954)
 E.G.V. Percival
 C.B. Wylam
- (9) H. Meier Acta chem.Scand. 12, 144 (1958)
- (10) J.K.N. Jones Nature 172, 161 (1953)
 J.B. Pridham
- (11) E.L. Hirst J.chem.Soc. 1659 (1949)
 J.K.N. Jones
- (12) P. Andrews J.chem.Soc. 2744 (1952)
 L. Hough
 J.K.N. Jones
- (13) R.L. Whistler Polysaccharide Chemistry,
 C.L. Smart Acad.Press, New York (1953)
- (14) S.A. Barker Meth.biochem.Anal. III, 213
 E.J. Bourne (1956)
 D.H. Wiffen

 W.B. Neely Advances Carbohydrate Chem.
 12, 13 (1957)
- (15) L.P. Kuhn Analytic.Chem. 22, 276 (1950)
- (16) L.J. Bellamy Ultrarotspektrum und chem.Kon-
 stitution, Steinkopff, Darmstadt
 (1955)
- (17) F. Oehme Z.Naturforschg. 14b, 779 (1959)

- (18) H. Starke Wiedemann's Ann. 60, 629 (1897)
- (19) L. Malaprade Compt.rend. 186, 382 (1928)
- (20) E.L. Jackson Org.Reactions II, 341, Wiley,
New York (1944)
- (21) J.M. Bobbit Advances Carbohydrate Chem.
11, 1 (1956)
- (22) J.R. Dyer Meth.biochem.Anal. III, 111 (1956)
- (23) J.G. Buchanan J.chem.Soc. 3162 (1950)
C.A. Dekker
A.G. Long
- (24) J.T. Edward J.chem.Soc. 3631 (1952)
D.M. Waldron
- (25) G.W. Huffmann J.Amer.chem.Soc. 77, 4346 (1955)
B.A. Lewis
F. Smith
D.R. Priestestersbach
- (26) R. Criegee Sitzber.Ges.Beförder.ges.Naturw.
Marburg, 69, 25 (1934)
cit.: C. 34 II, 2515

R. Derungs Dissertation, Zürich (1958)
- (27) T.G. Halsall J.chem.Soc. 1427 (1947)
E.L. Hirst
J.K.N. Jones

C.C. Price J.Amer.chem.Soc. 64, 552 (1942)
M. Knell
- (28) K.H. Meyer Helv.chim.Acta 32, 1102 (1949)
P. Rathgeber 31, 1540 (1948)
- (29) R. Jeanloz Experientia 6, 52 (1950)
- (30) A.S. Perlin J.Amer.chem.Soc. 76, 4101(1954)
- (31) A.L. Potter J.Amer.chem.Soc. 70, 3488 (1948)
W.Z. Hassid
- (32) F.S.H. Head J.Textile Inst. 44, T 209 (1953)
- (33) F.S.H. Head J.chem.Soc. 2046 (1952)
G.J. Hughes
- (34) M. Morrison J.Amer.chem.Soc. 75, 1502 (1953)
A.C. Küyper
S.M. Orton
- (35) E. Eegriwe Z.analyt.Chem. 89, 121 (1932)

- (36) H.E. Carter
F.J. Glick
W.P. Norris
G.E. Phillips J.biol.Chemistry 170, 285
(1947)
- (37) N.W. Pirie Biochem.J. 40, 100 (1946)
- (38) M. Abdel-Akher
F. Smith J.Amer.chem.Soc. 73, 994
(1951)
- (39) T.G. Halsall
E.L. Hirst
J.K.N. Jones J.chem.Soc. 1427 (1947)
- (40) J.C. Rankin
A.J. Jeans J.Amer.chem.Soc. 76, 4435
(1954)
- (41) P.F. Fleury
J. Lange J.pharm.chim. 17, 107 (1933)
- (42) L. Malaprade Bull.Soc.chim.France 43, 683
(1928)
- (43) C.E. Grouthamel
A.M. Hayes
D.S. Martin J.Amer.chem.Soc. 73, 82 (1951)
- (44) H.L. Frommhamen Analytic.Chem. 28, 1202 (1956)
- (45) E.L. Hirst J.chem.Soc. 70 (1942)
- (46) E.L. Hirst
J.K.N. Jones J.chem.Soc. 120 (1948)
- (47) F. Smith J.chem.Soc. 744 (1939)
- (48) J.K.N. Jones J.chem.Soc. 1055 (1947)
- (49) E.L. Hirst
J.K.N. Jones J.chem.Soc. 506 (1946)
- (50) V.C. Barry
J.E. McCormick J.chem.Soc. 3692 (1954)
- (51) D.A. McFayden J.biol.Chemistry 158, 107
(1945)
- (52) P.F. O'Dea
R.A. Gibbons Biochem.J. 55, 580 (1953)
- (53) M. Lambert
A.C. Weish Canad.J.Res. 28, 83 (1950)
- (54) K.H. Meyer
G. Noelting
P. Bernfeld Helv.chim.Acta 31, 103 (1948)
- (55) V.C. Barry Nature 152, 538 (1943)

- | | | |
|------|---|--|
| (56) | P.A. Finan
P.S. O'Colla | Chem.and Ind. 1958, 493 |
| (57) | P.A. Finan
A. Nolan
P.S. O'Colla | Chem.and Ind. 1958, 1404 |
| (58) | P.S. O'Colla | Proc.R.Irish Acad. 1953,
<u>55b</u> , 165 |
| (59) | T. Dillon
D.F. O'Ceallachain
P.S. O'Colla | Proc.R.Irish Acad. 1953,
<u>55b</u> , 331; 1954, <u>57b</u> , 31 |
| (60) | Houben-Weyl
E. Müller | Methoden der org. Chemie,
Analyt.Methoden, 344, Thieme,
Stuttgart (1953) |
| (61) | F. Smith
R. Montgomery | Meth.biochem.Anal. III, 153
(1956) |
| (62) | El S. Amin | J.chem.Soc. 828, (1956) |
| (63) | I.S. Fisher
E.E. Percival | J.chem.Soc. 2666 (1957) |
| (64) | A.J. Erskine
J.K.N. Jones | Canad.J.Chem. <u>35</u> , 1174 (1957) |
| (65) | J. Mullan
E.G.V. Percival | J.chem.Soc. 1501 (1940) |
| (66) | F. Brown
E.L. Hirst
J.K.N. Jones | J.chem.Soc. 1761 (1949) |
| (67) | C.M. Fear
R.C. Menzies | J.chem.Soc. 937 (1926) |
| (68) | R.E. Gill
E.L. Hirst
J.K.N. Jones | J.chem.Soc. 1025 (1946) |
| (69) | E.L. Hirst
J.K.N. Jones | J.chem.Soc. 120(1948) |
| (70) | I.E. Muskat | J.Amer.chem.Soc. <u>56</u> , 693 (1934)
2449 (1934) |
| (71) | H. Freudenberg
H. Boppel | Ber.dtsch.chem.Ges.
<u>71</u> , 2505 (1938) |
| (72) | L. Hough
J.K.N. Jones | Chem.and Ind. 1952, 380 |
| (73) | F. Vieböck
A. Schwappach | Ber.dtsch.chem.Ges. <u>63</u> , 2818,
3207 (1930) |

- (74) G.N. Kowkabany *Advances Carbohydrate Chem.*
 9, 34 (1954)
- (75) L. Hough *Meth.biochem.Anal.* I, 205 (1954)
- (76) I.M. Hais *Handbuch der Papierchromatogra-*
K. Maček *phie, Fischer, Jena* (1958)
- (77) L. Hough *J.chem.Soc.* 1702 (1950)
J.K.N. Jones
W.H. Wadman
- (78) E.L. Hirst *J.chem.Soc.* 928 (1949)
L. Hough
J.K.N. Jones
- (79) F. Brown *Nature* 161, 720 (1948)
E.L. Hirst
L. Hough
J.K.N. Jones
W.H. Wadman
- (80) R.A. Edington *J.chem.Soc.* 3554 (1955)
E.E. Percival
- (81) A.B. Foster *Advances Carbohydrate Chem.*
 12, 81 (1957)
- (82) S.M. Partridge *Nature*164, 443 (1949)
- (83) G.O. Aspinall *Advances Carbohydrate Chem.*
 9, 131 (1954)
- (84) W.W. Binkley *Advances Carbohydrate Chem.*
 10, 55 (1955)
- (85) L. Hough *J.chem.Soc.* 2511 (1949)
J.K.N. Jones
W.H. Wadman
- (86) G.O. Aspinall *J.chem.Soc.* 3627 (1958)
- (87) G.O. Aspinall *J.chem.Soc.* 4188 (1957)
R.J. Ferrier
- (88) G.O. Aspinall *J.chem.Soc.* 4469 (1957)
R.J. Sturgeon
- (89) J.D. Geerdes *J.Amer.chem.Soc.* 77, 3572
F. Smith (1955)
- (90) J.D. Geerdes *Analytic.Chem.* 26, 264 (1954)
B.A. Lewis
R. Montgomery
F. Smith
- (91) D.J. Bell *J.chem.Soc.* 473 (1944)

- (92) W.J. Whelan Chem.and Ind. 78 (1954)
K. Morgan
- (93) B. Lindberg Acta chem.Scand. 8, 569
B. Wickberg (1954)
- (94) K. Hess Ber.dtsch.chem.Ges.
F. Neumann 68, 1371 (1935)
- (95) S.K. Chanda J.chem.Soc. 1289 (1950)
E.L. Hirst
E.G.V. Percival
- (96) J.K. Bartlett Chem.and Ind. 76 (1951)
L. Hough
J.K.N. Jones
- (97) J.K.N. Jones Biochem.J. 58, 288 (1954)
J.B. Pridham
- (98) D.J. Bell J.chem.Soc. 3760 (1952)
D.J. Manners
A. Palmer
- (99) M. Dubois Nature 168, 167 (1951)
K. Gilles
J.K. Hamilton
P.A. Rebers
F. Smith
- (100) R.H. Marchessault J.Polymer Sci. 43, 71 (1960)
C.Y. Liang
- (101) T.G. Bonner J.chem.Soc. 3314 (1959)
E.J. Bourne
S. McNally
- (102) C.L. Mehltretter Ind.Engng.Chem. 49, 350
J.C. Rankin (1957)
P.R. Watson
- (103) D.B. Sprinson J.biol.Chem. 164, 417 (1946)
E. Chargaff
- (104) G.J. Buist J.chem.Soc. 1406 (1954)
C.A. Bunton
- (105) F.S.H. Head J.chem.Soc. 603 (1954)
G. Hughes
- (106) E. Müller Ber.dtsch.chem.Ges.
O. Friedberger 35, 2652 (1902)
- (107) F.G. Fischer Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.
H. Dörfel 301, 224 (1955)
- (108) J. Jackson J.chem.Soc. 79 (1940)
F. Smith

- (109) K.A. Granath J.colloid Sci. 13, 308 (1958)
- (110) R.U. Lemieux Canad.J.Chem. 34, 1365 (1956)
C.T. Bishop
G.E. Pelletier
- (111) K.H. Meyer Makromolekulare Chemie, Geest
H. Mark und Portig, Leipzig (1950)
- (112) G. Meyerhoff Angew.Chem. 72, 699 (1960)
- (113) S.W. Challinor J.chem.Soc. 258 (1931)
W.N. Haworth
E.L. Hirst
- (114) J. Jackson J.chem.Soc. 74 (1940)
F. Smith
- (115) H.D. Graham J.Food Sci. 26, 365 (1961)
L. Thomas
- (116) W.N. Haworth J.chem.Soc. 577 (1937)
E.L. Hirst
F.A. Isherwood
- (117) H. Staudinger Liebigs Ann.Chem.
E. Husemann 527, 195 (1937)
530, 1 (1937)
- (118) E.V. White J.Amer.chem.Soc. 76, 4906 (1954)
- (119) J.K. Hamilton J.Amer.chem.Soc. 79, 443 (1957)
D.R. Spriestersbach
F. Smith
- (120) P. Andrews J.chem.Soc. 4090 (1953)
J.K.N. Jones
- (121) P. Andrews J.chem.Soc. 1724 (1954)
J.K.N. Jones
- (122) G.O. Aspinall J.chem.Soc. 3830 (1956)
E.G. Meek
- (123) G.O. Aspinall J.chem.Soc. 215 (1958)
R.B. Rashbrook
- (124) G.G.S. Dutton J.Amer.chem.Soc. 80, 4420 (1958)
K. Hunt
- (125) G.G.S. Dutton J.Amer.chem.Soc. 78, 2905 (1956)
F. Smith
- (126) I.D. Fleming J.chem.Soc. 2831 (1956)
E.L. Hirst
D.J. Manners

- (127) A.R.N. Gorrod J.chem.Soc. 2522 (1954)
J.K.N. Jones
- (128) J.K.N. Jones J.chem.Soc. 3001 (1955)
J.R. Nunn
- (129) C.M. Rafique J.Amer.chem.Soc. 72, 4634
F. Smith (1950)
- (130) S. Peat J.chem.Soc. 3916 (1957)
W.J. Whelan
P.J.P. Roberts
- (131) J.K.N. Jones J.chem.Soc. 669 (1957)
T.J. Painter
- (132) B.O. Lindgren Acta chem.Scand. 11, 1365 (1957)
- (133) F. Smith J.Amer.chem.Soc. 70, 3249 (1948)
- (134) R.L. Whistler J.Amer.chem.Soc. 76, 1668 (1954)
- (135) R.L. Whistler J.Amer.chem.Soc. 72, 2524 (1950)
Z.F. Ahmed
- (136) E.V. White J.Amer.chem.Soc. 76, 4906 (1954)
- (137) E.L. Hirst J.chem.Soc. 1278 (1948)
J.K.N. Jones
- (138) J.K. Hamilton J.Amer.chem.Soc. 80, 4703 (1958)
H.W. Kircher
- (139) M.E. Henderson J.chem.Soc. 3519 (1958)
L. Hough
T.J. Painter
- (140) J. Ehrenthal J.Amer.chem.Soc. 76, 5509 (1954)
R. Montgomery
F. Smith
- (141) G.R. Savur J.chem.Soc. 2600 (1956)
- (142) R.L. Whistler J.Amer.chem.Soc. 78, 2851 (1956)
E. Masak
R.A. Plunkett
- (143) R.L. Whistler J.Amer.chem.Soc. 80, 1987 (1958)
G.E. Lauterbach
- (144) M.L. Wolfrom J.Amer.chem.Soc. 78, 4116 (1956)
A. Thompson
- (145) D.J. Manners J.chem.Soc. 867 (1955)
K. Maung
- (146) D.J. Manners J.chem.Soc. 2205 (1957)
A.R. Archibald

- (147) A.M. Liddle J.chem.Soc. 3432 (1957)
D.J. Manners
- (148) A.M. Liddle J.chem.Soc. 4708 (1957)
D.J. Manners
- (149) E.L. Falconer Canad.J.Chem. 34, 338 (1956)
G.A. Adams
- (150) C.Y. Liang J.Polymer Sci. 43, 85 (1960)
R.H. Marchessault
- (151) F.G. Pearson J.Polymer Sci. 43, 101 (1960)
R.H. Marchessault
C.Y. Liang

Lebenslauf

Am 26. Dezember 1933 wurde ich, Willi Weißer, als Sohn des Werkmeisters Reinhold Weißer und seiner Ehefrau Katharina, geb. Holzschuh, in Frankfurt a.M. geboren. Nach vierjähriger Grundschulzeit (Günthersburg-Schule in Frankfurt a.M.) besuchte ich 8 Jahre lang das Helmholtz-Realgymnasium in Frankfurt a.M., wo ich im März 1954 die Reifeprüfung ablegte. Danach absolvierte ich eine zweijährige Praktikantenzeit in der Höhen-Apotheke in Frankfurt a.M. und bestand im März 1956 die pharmazeutische Vorprüfung in Wiesbaden. Einem zweisemestrigen Studium an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz folgte zu Beginn des Sommersemesters 1957 die Immatrikulation an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt a.M., wo ich im April 1959 die pharmazeutische Staatsprüfung ablegte. Nach sechsmonatiger Tätigkeit als Kandidat in der Apothekenpraxis und nach weiterer naturwissenschaftlicher Ausbildung an der Johann Wolfgang Goethe-Universität erhielt ich im Mai 1960 die Approbation als Apotheker. Im November 1959 begann ich am Pharmazeutischen Institut der Universität (Direktor: Prof. Dr. C. Rohmann) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Janecke mit der Anfertigung meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. H. Janecke, meinem hochverehrten Lehrer und Doktorvater, möchte ich für seine vielseitigen Anregungen und wertvolle Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit meinen Dank aussprechen.

Meinem hochverehrten Lehrer, dem Direktor des Pharmazeutischen Instituts, Herrn Prof. Dr. C. Rohmann, danke ich für seine Unterstützung und freundliches Entgegenkommen, wodurch mir die Anfertigung der Arbeit in seinem Institut ermöglicht wurde.

Auch der Deutschen Forschungs-Gesellschaft sei an dieser Stelle für die zeitweilige finanzielle Unterstützung gedankt.

